

---

**Klinische Effektivität der Isoagglutininreduktion  
mittels therapeutischer Hämapherese  
im Rahmen AB0-inkompatibler  
Organtransplantationen**

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

**Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

Von Diana Lenk

geboren am 12.07.1986 in Gera

## Gutachter

1. Prof. Dr. med. Dagmar Barz, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. med. Marc-Oliver Grimm, Universitätsklinikum Jena
3. Priv.-Doz. Dr. med. Przemyslaw Pisarski, Universitätsklinikum Freiburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.12.2012

## Abkürzungsverzeichnis

ACD-A	Acidum-Citricum-Dextrose, Formel A
AGT	Antihumanglobulintest (= Coombs-Test)
AHG	Antihumanglobulinserum
AK	Antikörper
AMR	Antikörpervermittelte Rejektion (engl. antibody mediated rejection)
B-ALL	Akute lymphatische Leukämie der B-Zellreihe
DFPP	Doppelfiltrationsplasmapherese (engl. double filtration plasmapheresis)
EK	Erythrozytenkonzentrat
FFP	Gefrierfrischplasma (engl. fresh frozen plasma)
FSU	Friedrich-Schiller-Universität Jena
GKT	Gelkartentest
HLA	Humane Leukozytenantigene
HPA	Humane Plättchenantigene
HTx	Herztransplantation
HU	hohe Dringlichkeit (engl. High urgency)
IA	Immunadsorption(en)
Ig	Immunglobulin
ITP	Immunthrombozytopenie
i.v.	intravenös
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
Kg KG	Kilogramm Körpergewicht
L	Liter
LDL-Tx	Lebendleberspende/-transplantation (engl. living donor liver transplantation)
LDK-Tx	Lebendnierenspende/-transplantation (engl. living donor kidney transplantation)
LISS	Lösung geringer Ionenstärke (engl. low ionic strength solution)
LTx	Lebertransplantation
Max	Maximum
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MED	Median

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
Min	Minimum
min	Minuten
ml	Milliliter
MMF	Mycophenolat Mofetil
MW/ $\bar{x}$	Mittelwert
N	Stichprobengröße (Anzahl eingeschlossener Patienten)
NaCl	Physiologische Kochsalzlösung
Nr.	Nummer
NTx	Nierentransplantation
OR	Odds-Ratio (Quotenverhältnis)
p.o.	per os
RT	Röhrchentest
s.c.	subkutan
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SOP	Standardvorgehensweise (engl. standard operating procedure)
TK	Thrombozytenkonzentrat
TPA	Therapeutischer Plasmaaustausch
TPG	Transplantationsgesetz
UKJ	Universitätsklinikum Jena
VB	Vollblut

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>11</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>13</b>
2.1 Das AB0-Blutgruppensystem .....	13
2.2 AB0-Isoagglutinine.....	15
2.3 Nachweis erythrozytärer Antikörper .....	16
2.3.1 Grundlagen .....	16
2.3.2 Hämagglutinationstest .....	17
2.3.3 Antihumanglobulintest (Coombstest).....	18
2.3.4 Methoden zum Nachweis erythrozytärer Antikörper .....	20
2.3.4.1 Röhrchentest .....	20
2.3.4.2 Gelkartentest .....	20
2.4 Therapeutische Hämapherese .....	23
2.4.1 Therapeutische Immunadsorption .....	23
2.4.1.1 Prinzip des <i>Immunosorba</i> ®-Systems .....	25
2.4.1.2 Prinzip des <i>Glycosorb</i> ®-AB0-Systems .....	26
2.5 AB0-inkompatible Organtransplantationen.....	28
2.5.1 AB0-inkompatible Lebendspenden .....	28
2.5.1.1 AB0-inkompatible Nierenlebendspenden.....	29
2.5.1.2 AB0-inkompatible Leberlebendspende .....	30
2.6 Perioperative Konditionierung bei AB0-inkompatibler Lebendspende .....	32
2.6.1 Reduktion der Isoagglutinititer des Empfängers .....	33
2.6.2 Immunsuppressive Therapie des Empfängers .....	34
<b>3 Ziele .....</b>	<b>35</b>
<b>4 Patienten und Methoden .....</b>	<b>37</b>
4.1 Patienten .....	37
4.1.1 Patientenkollektiv .....	39
4.1.2 Kontrollkollektiv.....	40
4.1.3 Erfassung der Patientenparameter .....	41

4.1.4	Erfassung der Behandlungsparameter .....	41
4.2	Material und Geräte .....	42
4.2.1	Geräte.....	42
4.2.2	Säulensysteme.....	42
4.2.3	Einmalartikel.....	42
4.2.4	Material zur Bestimmung der Isoagglutininintiter .....	43
4.2.5	Gewinnung und Verarbeitung der Proben zur Bestimmung der Isoagglutininintiter.....	43
4.3	Methoden .....	44
4.3.1	Vorgehensweise bei Aufnahme der Patienten .....	44
4.3.2	Immunadsorptionsbehandlung.....	44
4.3.3	Behandlungsablauf .....	45
4.3.4	Jenaer Konditionierungsprotokoll für die AB0-inkompatible Nierenlebendspende.....	49
4.3.5	Jenaer Konditionierungsprotokoll für die AB0- inkompatible Leberlebendspende .....	49
4.3.6	Bestimmung der Isoagglutininintiter .....	50
4.3.6.1	Herstellung einer linearen Verdünnungsreihe .....	50
4.3.6.2	Röhrchentest .....	51
4.3.6.3	Gelkartentest.....	51
4.3.7	Verwendete Formeln .....	52
4.3.7.1	Hämatokrit-korrigiertes Plasmavolumen.....	52
4.3.7.2	Bestimmung der Titerreduktionsrate .....	52
4.3.7.3	Intra treatment titer drop und Average titer drop.....	53
4.3.7.4	Titer increment und Average titer increment.....	53
4.4	Statistik .....	54
4.4.1	Art der Auswertung .....	54
4.4.2	Begründung für die Wahl der Tests.....	55
4.4.2.1	Rangkorrelation nach Spearman.....	55
4.4.2.2	Kruskal-Wallis-Test.....	55
4.4.2.3	Mann-Whitney-U-Test und $\alpha$ -Adjustierung .....	56
4.4.2.4	Berechnung der Odds-Ratio .....	57
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
5.1	Charakterisierung des Patienten- und Kontrollkollektivs.....	58
5.1.1	Patientenparameter .....	58
5.1.2	Behandlungsparameter .....	59
5.2	Isoagglutininintiter der Patienten.....	60
5.3	Isoagglutininintiterreduktion innerhalb der Immunadsorptionen .....	61
5.4	Titerreduktionsraten der Patienten.....	62
5.5	Wiederanstieg der Isoagglutininintiter zwischen zwei Immunadsorptionen ...	63

5.6	Korrelation der Isoagglutinintiterreduktion innerhalb einer Immunadsorption mit dem Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumen.....	64
5.6.1	Absolute Isoagglutinintiterreduktion in Abhängigkeit vom Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumen .....	64
5.6.2	Durchschnittliche Isoagglutinintiterreduktion in Abhängigkeit vom Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumen .....	65
5.7	Einfluss der Höhe des Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens auf die durchschnittliche Isoagglutinintiterreduktion innerhalb einer IA.....	67
5.8	Wahrscheinlichkeit einer hohen durchschnittlichen Isoagglutinintiterreduktion in Abhängigkeit vom Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens .....	68
5.9	Anzahl der Immunadsorptionen bei Patienten mit hohen bzw. normalen Isoagglutinintitern vor erster Immunadsorption .....	70
5.9.1	Anzahl durchgeführter Immunadsorptionen in Abhängigkeit von der Höhe der Isoagglutinintiter vor der ersten Immunadsorption .....	70
5.9.2	Vergleich von Patienten- und Kontrollkollektiv hinsichtlich der Anzahl durchgeführter Immunadsorptionen in Abhängigkeit von der Höhe des Ausgangstiters.....	71
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>73</b>
6.1	Höhe der Isoagglutinintiter des Patienten- und Kontrollkollektivs .....	73
6.2	Diskussion der Isoagglutinintiterreduktion des Patienten- und Kontrollkollektivs .....	77
6.3	Diskussion des Wiederanstiegs der Isoagglutinintiter zwischen zwei Immunadsorptionen .....	80
6.4	Einfluss des Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens auf die Isoagglutinintiterreduktion .....	83
6.5	Die Rolle des Ausgangstiters vor Immunadsorption für die Anzahl der durchgeführten Immunadsorptionen.....	87
6.6	Vergleich der <i>Glycosorb®-AB0-Säulen</i> mit dem <i>Immunosorba®-System</i> zur Isoagglutinintiterreduktion vor AB0-inkompatibler Organtransplantation.....	89
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>Literatur- und Quellverzeichnis.....</b>	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>102</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>104</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>105</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>106</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Schematische Darstellung der terminalen Oligosaccharide der AB0-Antigene (Schenkel-Brunner 2000).....</b>	<b>14</b>
<b>Abbildung 2: Struktureller Aufbau der Immunglobuline IgG und IgM (Hoffbrand 2003) .....</b>	<b>17</b>
<b>Abbildung 3: Prinzip des Antihumanglobulintests (Coombs- Test) (Kretschmer et al. 2008).....</b>	<b>19</b>
<b>Abbildung 4: Prinzip des Gelkartentests (Copyright 2006: DiaMed AG, Cressier, Schweiz) .....</b>	<b>21</b>
<b>Abbildung 5: Verschiedene Grade der erythrozytären Agglutinationsreaktion bei einer Mikrotiterkarte mit sechs Säulen (Kiefel 2010) .....</b>	<b>22</b>
<b>Abbildung 6: Schematische Darstellung einer therapeutischen Immunadsorption unter Einsatz eines Adsorptionssäulenpaares (Berlit 2005) .....</b>	<b>24</b>
<b>Abbildung 7: Beispiel einer <i>Immunosorba®-Säule</i> (Copyright 2005: Fresenius Medical Care GmbH, Bad Homburg, Deutschland).....</b>	<b>26</b>
<b>Abbildung 8: Beispiel einer <i>Glycosorb®-A-Säule</i> (Copyright 2012: Glycorex Transplantation AB, Lund, Schweden) .....</b>	<b>27</b>
<b>Abbildung 9: Mögliche Blutgruppenkonstellationen bei AB0-kompatibler (links) und AB0-inkompatibler (rechts) Organtransplantation im Vergleich.....</b>	<b>29</b>
<b>Abbildung 10: Beispiel eines Konditionierungsprotokolls bei AB0-inkompatibler Nierenlebenspende unter Einsatz antigenspezifischer Immunadsorption und Rituximab (Genberg et al. 2010) .....</b>	<b>32</b>
<b>Abbildung 11: Altersverteilung der einzelnen Patienten .....</b>	<b>38</b>
<b>Abbildung 12: Darstellung der Patientendiagnosen .....</b>	<b>38</b>
<b>Abbildung 13: Der Adsorptions-Desorptionsautomat <i>Citem®10-Monitor</i> zur Steuerung der Immunadsorptionsbehandlung (Shapiro et al. 1990).....</b>	<b>45</b>
<b>Abbildung 14: Schematische Darstellung eines <i>Cobe® Spectra-Apheresesystems</i> (aus: GAMBRO BCT. 2005. COBE®Spectra™ Apheresis System, Essentials Guide, GAMBRO BCT).....</b>	<b>46</b>
<b>Abbildung 15: Darstellung der Zentrifugationskammer des <i>Cobe® Spectra-Apheresesystems</i> (Copyright 2005: GAMBRO BCT. 2005. COBE®Spectra™ Apheresis System, Essentials Guide, GAMBRO BCT) .....</b>	<b>46</b>
<b>Abbildung 16: Schematische Darstellung einer Immunadsorption mit Hilfe des <i>Immunosorba®-Systems</i> (Copyright 2005 Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland) .....</b>	<b>48</b>
<b>Abbildung 17: Anteil der Patientengruppen an allen Immunadsorptionen .....</b>	<b>59</b>



## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Wichtige Charakteristika des AB0-Blutgruppensystems .....</b>	<b>13</b>
<b>Tabelle 2: Übersicht der wichtigsten Charakteristika des Patientenkollektivs (Gruppe 1) .....</b>	<b>39</b>
<b>Tabelle 3: Übersicht der wichtigsten Charakteristika des Kontrollkollektivs (Gruppe 2-4).....</b>	<b>40</b>
<b>Tabelle 4: Schema zur Auswahl der zu verwendenden Testerythrozyten .....</b>	<b>52</b>
<b>Tabelle 5: Signifikanzschränken für das nach Schaffer modifizierte Holm- Verfahren für den Vergleich von drei unabhängigen Gruppen mit gesicherter Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test.....</b>	<b>57</b>
<b>Tabelle 6: Signifikanzschränken für das nach Schaffer modifizierte Holm- Verfahren für den Vergleich von drei unabhängigen Gruppen ohne gesicherte Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test .....</b>	<b>57</b>
<b>Tabelle 7: Blutgruppenverteilung des Patienten- und Kontrollkollektivs .....</b>	<b>58</b>
<b>Tabelle 8: Behandlungsparameter aller 151 durchgeführten Immunadsorptionen</b>	<b>59</b>
<b>Tabelle 9: Maximal gemessene Isoagglutininintiter vor und nach Immunadsorption aller 25 Patienten .....</b>	<b>60</b>
<b>Tabelle 10: Gruppenspezifische maximale Isoagglutininintiter vor einer Immunadsorption .....</b>	<b>60</b>
<b>Tabelle 11: Gruppenspezifische maximal gesenkte Isoagglutininintiterstufen pro IA (intra treatment titer drop).....</b>	<b>61</b>
<b>Tabelle 12: Gruppenspezifischer maximaler aTD pro IA für die einzelnen Isoagglutinine .....</b>	<b>61</b>
<b>Tabelle 13: Gruppenspezifische durchschnittliche Titerreduktionsraten für die verschiedenen Isoagglutinine.....</b>	<b>62</b>
<b>Tabelle 14: Gruppenspezifisches maximales „Titer increment“ (TI) der Isoagglutinine .....</b>	<b>63</b>
<b>Tabelle 15: Gruppenspezifisches maximales „Average titer increment“ (aTI) der Isoagglutinine .....</b>	<b>64</b>
<b>Tabelle 16: Überblick der statistisch signifikanten Korrelationen zwischen absoluter Isoagglutininintiterreduktion innerhalb einer IA und Hämatokrit-korrigiertem Plasmavolumen.....</b>	<b>65</b>
<b>Tabelle 17: Überblick der statistisch signifikanten Korrelationen zwischen durchschnittlicher Isoagglutininintiterreduktion innerhalb einer IA und dem Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumen.....</b>	<b>66</b>
<b>Tabelle 18: Signifikante Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Test für den Einfluss des Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens auf die durchschnittliche Isoagglutininintiterreduktion.....</b>	<b>67</b>
<b>Tabelle 19: Ergebnisse des paarweisen Vergleichs der drei Plasmagruppen untereinander zur Untersuchung der Abhängigkeit der durchschnittlichen Isoagglutininintiterreduktion vom Hämatokrit- korrigierten Plasmavolumen (6. IA GKT) .....</b>	<b>68</b>

<b>Tabelle 20: Ergebnisse der Berechnung der Chance (Odds-Ratio) für eine durchschnittlichen Isoagglutinititerreduktion <math>\geq 2,5</math> Titerstufen in Abhängigkeit des Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens mit zugehörigen Konfidenzintervallen .....</b>	<b>69</b>
<b>Tabelle 21: Gruppenspezifischer Anteil der Patienten mit hohen Ausgangstitern an allen 25 Patienten .....</b>	<b>70</b>
<b>Tabelle 22: Überblick über die Ergebnisse des paarweisen Vergleichs der Ausgangstitergruppen mittels Mann-Whitney-U-Tests zum statistischen Nachweis eines signifikanten Unterschiedes hinsichtlich der Anzahl durchgeführter Immunadsorptionen .....</b>	<b>71</b>
<b>Tabelle 23: Gruppenspezifische durchschnittliche Ausgangstiter mit zugehöriger durchschnittlicher Anzahl an Immunadsorptionen für die Patienten mit hohen Ausgangstitern .....</b>	<b>72</b>
<b>Tabelle 24: Gruppenspezifische durchschnittliche Ausgangstiter mit zugehöriger durchschnittlicher Anzahl an Immunadsorptionen für die Patienten mit normalen Ausgangstitern .....</b>	<b>72</b>

# 1 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die Kurz- und Langzeitresultate AB0-inkompatibler Nieren- und Leberlebendspenden konnten in den letzten Jahren kontinuierlich verbessert werden, sodass hierdurch eine Möglichkeit zur Erweiterung des Organdonor pools gegeben ist. Um dabei eine hyperakute Transplantatabstoßung durch die präformierten Isoagglutinine des Empfängers zu verhindern und die immunologische Barriere des AB0-Blutgruppensystems zu überwinden, wurden für die Patienten spezielle Konditionierungsprotokolle entwickelt. Diese fokussieren die perioperative Eliminierung der Isoagglutinine des Empfängers mittels therapeutischer Hämapherese in Kombination mit einer intensivierten Immunsuppressionstherapie. Perioperative Immunadsorptionsbehandlungen mit Hilfe isoagglutinin-spezifischer *Glycosorb®-AB0-Säulen* stellen dabei ein in Europa etabliertes Behandlungsprinzip dar. Diese Form der Konditionierung wird auch in Jena genutzt.

**Fragestellung:** Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Effektivität der Isoagglutinititerreduktion durch antigenspezifische Immunadsorption vor AB0-inkompatibler Organtransplantation zu untersuchen. Hierfür wurde die Titerreduktion bei Verwendung der *Glycosorb®-AB0-Säulen* mit der des nicht-isoagglutinin-spezifischen *Immunosorba®-Systems* verglichen. Es sollten die Hypothesen geprüft werden, (1) wie effektiv die Isoagglutinineliminierung beider Säulen ist, (2) ob und welcher Zusammenhang zwischen Isoagglutinititerreduktion und der Menge des behandelten Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens besteht und (3) ob die Höhe des Isoagglutinititers vor erster Immunadsorption (sog. Ausgangstiter) die Anzahl der benötigten Behandlungen beeinflusst.

**Methodik:** Für die Arbeit wurden die Isoagglutinititer von 25 Patienten untersucht, die sich im Zeitraum Juni 2006 bis März 2010 einer Immunadsorptionstherapie im Institut für Transfusionsmedizin der FSU Jena unterzogen. Das Patientenkollektiv setzte sich aus sieben Patienten zusammen, die mit Hilfe der *Glycosorb®-AB0-Säulen* auf eine AB0-inkompatible Organtransplantation vorbereitet wurden. Dieses wurde mit einem Kontrollkollektiv aus 18 Probanden, die mit dem *Immunosorba®-System* behandelt wurden, verglichen. Die Bestimmung der prä- und posttherapeutischen Isoagglutinititer aus Patientenplasma erfolgte mit Hilfe eines Röhrchen- und eines Gelkartentests. Die Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS 18.0.

**Ergebnisse:** Die Höhe der gemessenen Isoagglutinititer lag insgesamt im Bereich normaler interindividueller Variabilität. Aufgrund der recht hohen IgG-Isoagglutinititer und vor dem Hintergrund der Krankengeschichte der Patienten wird postuliert, dass alle Patienten auf verschiedene Weise immunisiert waren. Die Reduktion der Isoagglutinititer kann mit maximal vier bzw. fünf gesenkten Titerstufen pro IA im Patienten- bzw. Kontrollkollektiv als effektiv angesehen werden. Beide Säulen wiesen dabei eine annähernd vergleichbar gute Isoagglutininreduktion auf. Anhand der durchgeführten Korrelationsanalyse konnte weder für das Patienten- noch für das Kontrollkollektiv ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Isoagglutinititerreduktion und behandeltem Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumen ermittelt werden. Auch der Vergleich verschiedener Plasmagruppen mittels Mann-Whitney-U-Test und die Berechnung von Odds-Ratios konnten keine genaueren Hinweise auf den Einfluss des Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens auf die Isoagglutinititerreduktion erbringen. Eine konkrete Empfehlung hinsichtlich des optimal zu behandelnden Plasmavolumens kann somit nicht abgegeben werden. Es ergaben sich jedoch Hinweise, dass Patienten mit hohen Ausgangstitern mehr Immunadsorptionen benötigen könnten als Patienten mit normalen Ausgangstitern. Als Hauptproblem der Konditionierung kann unabhängig vom verwendeten Säulensystem der Wiederanstieg der Isoagglutinititer zwischen zwei aufeinander folgenden IA (sog. Titerrebound) festgehalten werden. Dieser zeigte sich im Kontrollkollektiv höher als im Patientenkollektiv.

**Schlussfolgerungen:** Die Effektivität der *Glycosorb®-AB0-Säulen* zur Isoagglutininreduktion vor AB0-inkompatibler Organtransplantation konnte bestätigt werden. Durch den Einsatz der Säulen kann eine effektive Isoagglutinindepletion auf den zuvor festgelegten Zieltiter erreicht werden. Im Vergleich zeigte aber auch das nicht-isoagglutinin-spezifische *Immunosorba®-System* eine ähnlich gute Effektivität. Ob und welcher Zusammenhang zwischen Isoagglutinititerreduktion und Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumen besteht, konnte durch die vorliegende Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Auch die Rolle des Ausgangstiters für die Anzahl der perioperativen Immunadsorptionen bleibt weiter zu evaluieren. Künftige Studien sollten daher die hier durchgeführten Untersuchungen mit größerer Probandenzahl und homogenerer Blutgruppenverteilung reevaluieren. Im Fokus weiterer Forschungen sollten dabei vor allem auch die Prophylaxe und die Therapie des Isoagglutinititerrebounds stehen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das AB0-Blutgruppensystem

Das 1900 von Karl Landsteiner entdeckte AB0-Blutgruppensystem gilt von den derzeit bekannten Blutgruppensystemen als das wichtigste für solide Organtransplantationen (Shishido und Hasegawa 2005). Zusammen mit dem humanen Leukozytenantigensystem stellt es das Haupthistokompatibilitätssystem des Menschen dar.

Durch die Antigene A und B werden die vier Phänotypen 0, A, B und AB definiert. Klinisch relevant ist zudem die Unterteilung des Antigens A in A1 und A2, sodass zusätzlich die Untergruppen A1, A2, A1B und A2B existieren. A1-Erythrozyten tragen im Vergleich zu A2-Erythrozyten mehr Antigen A und exprimieren zusätzlich das Antigen A1. Die Vererbung der AB0-Blutgruppenmerkmale erfolgt kodominant. Die Häufigkeit der Blutgruppen beträgt in Deutschland für Gruppe 0 41%, für Gruppe A 43%, für Gruppe B 11% und für Gruppe AB 5% (Kiefel 2010). Einen Überblick über die wichtigsten Charakteristika des AB0-Systems gibt Tabelle 1.

**Tabelle 1: Wichtige Charakteristika des AB0-Blutgruppensystems**

AB0-Blutgruppe	Genotyp	AB0-Antigene	Isoagglutinine
0	0/0	keine	Anti-A1, -A2, -B
A1	A1/A1, A1/A2, A1/0	A, A1	Anti-B
A2	A2/A2, A2/0	A	Anti-B
B	B/B, B/0	B	Anti-A1, -A2
A1B	A1/B	A, A1, B	-
A2B	A2/B	A, B	-

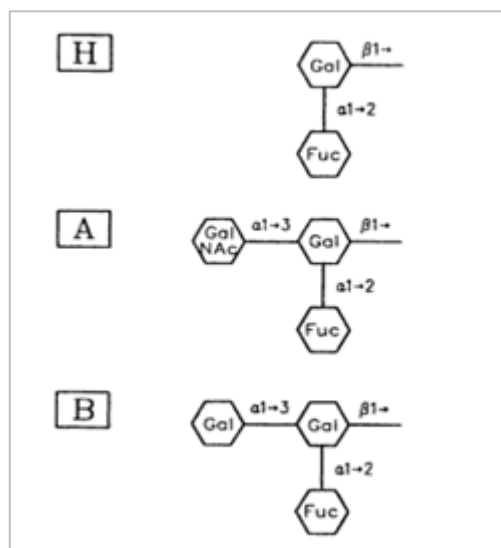
---

Die AB0-Antigene des Menschen beruhen auf terminalen Verzweigungen von Kohlenhydratketten, welche an Lipide (Glycolipide) oder Proteine (Glycoproteine) angeheftet sind (Abbildung 1). Diese Antigene finden sich nicht nur auf der Membran der Erythrozyten, sondern auch auf zahlreichen anderen Zellen und Geweben wie Leukozyten, Thrombozyten, Epithel- und Endothelzellen, Lunge, Herz, Leber und Niere (Glynn und Holborow 1959). Bei den meisten Menschen werden die AB0-Antigene zudem in löslicher

Form in Körperflüssigkeiten wie Speichel, Harn und Schweiß sezerniert, man spricht bei diesen Personen von sog. „Sekretoren“. Die Verzweigung der Kohlenhydratketten sowie die Höhe der AB0-Antigendichte nehmen von der Geburt bis ins Erwachsenenalter zu.

Die endständigen Kohlenhydratabschnitte werden dabei von genetisch determinierten Glycosyltransferasen modifiziert. Durch die genetisch bedingten Polymorphismen dieser Glycosyltransferasen, deren Genort auf dem langen Arm des Chromosoms neun liegt, wird die Vielfältigkeit der Proteine und Kohlenhydrate bedingt.

Ausgangsstoff der AB0-Antigene ist eine Grund- bzw. Vorläufersubstanz, die sich aus der endständigen Sequenz Galactose-N-Acetylglucosamin-Galactose zusammensetzt. Bei Personen der Blutgruppe 0 wird durch die  $\alpha$ -L-Fucosyltransferase terminal eine Fucose zugesetzt, sodass die sogenannte „H-Substanz“ entsteht. Diese „H-Substanz“ wird bei Menschen mit Blutgruppe A oder B durch spezielle Glycosyltransferasen weiter modifiziert. Das A-Antigen entsteht, indem terminal ein N-Acetyl-Galactosamin durch die  $\alpha$ -1,3-N-Acetylgalactosaminyltransferase an die „H-Substanz“ angefügt wird. Für das B-Antigen wird stattdessen eine Galactose durch die  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase an das terminale Ende gehängt. Personen der Blutgruppe AB besitzen beide Enzyme, sodass auf der Oberfläche ihrer Zellen bzw. Gewebe sowohl Glycoproteine und Glycolipide der Blutgruppe A als auch B zu finden sind.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der terminalen Oligosaccharide der AB0-Antigene (Schenkel-Brunner 2000)**

*Abkürzungen:* H = H-Substanz, A= Antigen A, B = Antigen B, Fuc = Fucose, Gal = Galactose, NAcGal = N-Acetylgalactosamin. Pfeile stehen für die Art der Verknüpfung der Oligosaccharide.

## 2.2 AB0-Isoagglutinine

Die AB0-Isoagglutinine sind obligate Alloantikörper im Plasma des Menschen, die gegen körperfremde AB0-Blutgruppenantigene gerichtet sind. In der Regel handelt es sich bei Isoagglutininen um IgM-Antikörper, in geringerem Maße können auch IgG- und IgA-Antikörpern vorkommen. Sie müssen bei jeder Blutgruppenbestimmung mit Hilfe von A1-, A2-, B- und 0-Testerythrozyten bestimmt werden. Die Titer der Isoagglutinine steigen physiologisch bis ca. zum zehnten Lebensjahr an und fallen mit zunehmendem Alter wieder mehr oder weniger ab. Reagiert ein Isoagglutinin mit dem AB0-Antigen gegen das es gerichtet ist, kann über die gebildeten Immunkomplexe in Anwesenheit von Komplement eine Hämolyse bewirkt werden. Dies ist der Grund weshalb keine AB0-inkompatiblen Transfusionen durchgeführt werden dürfen und es bei der Übertragung eines AB0-inkompatiblen Organs zu einer Abstoßungsreaktion kommt.

Im Gegensatz zu den AB0-Antigenen sind die zugehörigen Isoagglutinine nicht genetisch determiniert, sondern entwickeln sich erst innerhalb des ersten Lebensjahres. Die Bildung der Isoagglutinine erfolgt durch den Kontakt des Säuglings mit Kohlenhydratstrukturen auf humansymbiotischen Bakterien wie *Escherichia coli*. Diese bakteriellen Kohlenhydratstrukturen ähneln den erythrozytären Antigenen A und B des Menschen, weshalb Personen, welche die AB0-Antigene A oder B nicht auf ihren Zellen und Geweben besitzen, nach dem Kontakt die korrespondierenden Isoagglutinine produzieren. Personen der Blutgruppe A entwickeln demnach Anti-B-Isoagglutinine, Personen der Blutgruppe B Anti-A1- und/oder Anti-A2-Isoagglutinine und Patienten der Blutgruppe 0 Anti-A1-, Anti-A2- und Anti-B-Isoagglutinine. Personen der Blutgruppe AB weisen keine Isoagglutinine auf. Auch bei Neugeborenen lassen sich noch keine Isoagglutinine nachweisen, weshalb die Blutgruppenbestimmung in diesem Alter erschwert wird.

Isoagglutinine sind neben den hämolytischen Transfusionsreaktionen und akuten Rejektion bei AB0-inkompatibler Organtransplantation auch für einige andere Erkrankungen wie beispielsweise die AB0-Erythroblastose, den Morbus haemolyticus neonatorum, verantwortlich. Bei dieser Erkrankung kann es durch IgG-Isoagglutinine bei entsprechender Blutgruppenkonstellation (am häufigsten: Mutter 0, Kind A) zu einer fetalen Hämolyse kommen. Eine intrauterine Anämie ist jedoch aufgrund der geringen Ausprägung der AB0-Antigene auf den fetalen Erythrozyten sehr selten.

## **2.3 Nachweis erythrozytärer Antikörper**

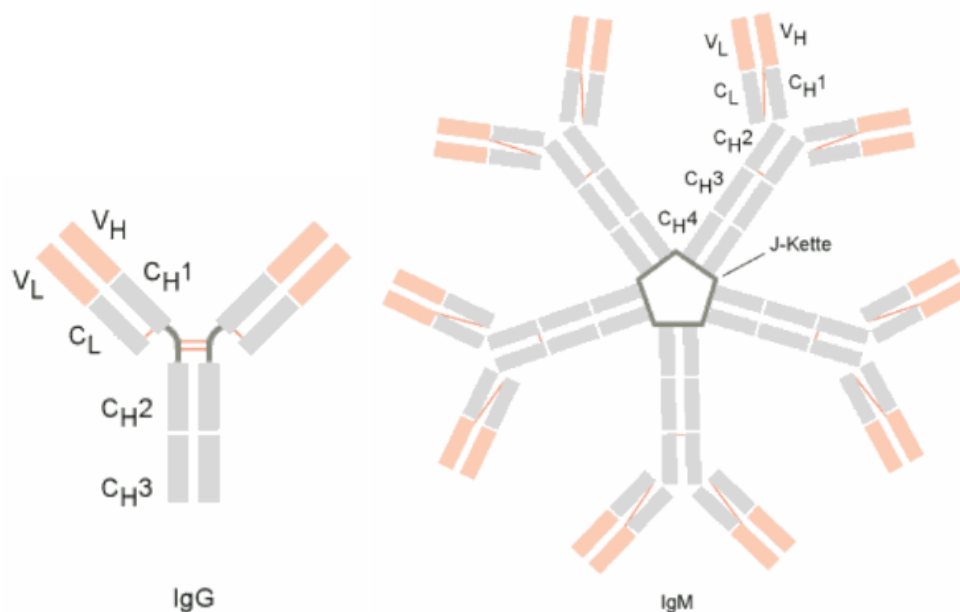
### **2.3.1 Grundlagen**

Die erythrozytären AB0-Oberflächenantigene A und B können immunogen wirken und zur Bildung von Antikörpern führen. Diese Antikörper sind entweder gegen die Erythrozytenantigene anderer Individuen (Alloantikörper) oder gegen die eigenen Erythrozytenantigene gerichtet (Autoantikörper). Die sog. natürlichen bzw. regulären Antikörper entstehen hierbei durch unspezifische Stimuli wie beispielsweise enterale Sensibilisierung mit bakteriellen Polysaccharidstrukturen. Es handelt sich meist um Antikörper der IgM-Klasse, z. T. auch der IgG- und seltener der IgA-Klasse. Beispiel sind die bereits beschriebenen Isoagglutinine des AB0-Blutgruppensystems. Entstehen die Antikörper hingegen durch spezifische Stimulation wie allogene Transfusionen, fetomaternale Hämorrhagien im Rahmen einer Schwangerschaft oder Organtransplantation, spricht man von irregulären bzw. Immunantikörpern. Diese gehören in der Regel zur IgG-Klasse und sind häufig gegen Rhesus-, Kell-, Kidd-, Duffy- oder die humanen Leukozytenantigene gerichtet.

Nach dem serologischen Verhalten oben beschriebener Antikörper wird zwischen sogenannten kompletten und inkompletten Antikörpern sowie zwischen Wärme- und Kälteantikörpern unterschieden. Bei kompletten Antikörpern handelt es sich in den meisten Fällen um Antikörper der Immunglobulinklasse IgM (Abbildung 2). Diese sind aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes und ihrer penta- bzw. hexameren Form bereits im physiologischen Kochsalzmilieu in der Lage spontan und ohne Einsatz von Hilfssubstanzen (Supplement) sowohl an die Erythrozytenmembran zu binden als auch Brücken zwischen benachbarten Erythrozyten auszubilden, wodurch diese sichtbar agglutiniert werden. Zudem kann durch Aktivierung des Komplementsystems eine Hämolyse der Erythrozyten bewirkt werden. Inkomplette Antikörper hingegen, bei denen es sich zumeist um Antikörper vom Typ IgG handelt, sind aufgrund ihrer Struktur lediglich in der Lage an die Erythrozytenmembran zu binden (Abbildung 2). Eine Hämolyse oder Agglutination kann ohne den Einsatz von Supplement jedoch nicht bewirkt werden. In vielen Fällen können inkomplette Antikörper jedoch durch Aufschwemmung der Erythrozyten in einem Supplement wie Rinderserumalbumin, kompatibelem Humanserum, Dextran, Gelatine oder in Lösungen geringer Ionenstärke (LISS-Lösung) nachgewiesen werden, da durch den Einsatz des Supplements die Brückenbildung zwischen den



Erythrozyten und somit auch die Agglutination doch ermöglicht wird. Eine einfache und häufig angewandte Methode zum Nachweis inkompletter Antikörper ist zudem der Einsatz eines sekundären Antikörpers, durch den die Distanz zwischen den Erythrozyten überwunden und eine Agglutination ermöglicht wird (Antihumanglobulintest, Coombs-Test). Liegt das Temperaturoptimum der Antikörper bei 37 °C spricht man von Wärmeantikörpern, liegt es zwischen 0 und 4 °C von Kälteantikörpern. Diese serologische Einteilung muss bei der Auswahl und Durchführung der Tests zum Nachweis der Antikörper beachtet werden.



**Abbildung 2: Struktureller Aufbau der Immunglobuline IgG und IgM (Hoffbrand 2003)**

IgG liegt als Monomer vor, IgM ist aus fünf Monomeren durch eine J(oining)-Kette zu einem Pentamer zusammengesetzt.

*Abkürzungen:* H = schwere Ig-Kette, L = leichte Ig-Kette, V = variable Domäne, C = konstante Domäne, J-Kette = Joining-Kette. Zahlen stehen für den Rang der Domäne.

### 2.3.2 Hämagglutinationstest

Eine der wichtigsten Bestimmungsmethoden zum Nachweis erythrozytärer Antikörper im Plasma eines Patienten stellt die Hämagglutination dar. Bei dieser Methode werden Testerythrozyten durch die gesuchten Antikörper agglutiniert und die Antikörper somit indirekt nachgewiesen. Dieses Testverfahren kann auf Objektträgern, in Röhrchen, auf Platten, in Kapillaren, in Mikrotiterplatten, in ELISA-Strips oder in Kartensystemen durchgeführt werden.

Für den Hämagglutinationstest werden ein bis drei Tropfen Patientenserum oder -plasma zu einem Tropfen Testerythrozyten gegeben, die in 3-5%iger NaCl-Lösung suspendiert sind. Der Ansatz wird leicht gemischt und die vorgegebene Inkubationszeit, die sich nach der Antikörperaffinität und -avidität richtet, abgewartet. Handelt es sich um komplette Antikörper wird die Agglutination meist nach 1 bis 30 Minuten sichtbar. Der Einsatz von Supplement zur Verstärkung der Reaktion ist nicht nötig. Handelt es sich jedoch um inkomplette Antikörper, müssen dem Ansatz noch ein bis zwei Tropfen 20-30%iges Supplement wie Rinderserumalbumin oder LISS-Lösung zugefügt werden. Erst danach kann die Agglutination der Erythrozyten erfolgen, man spricht von Supplementtest. Eine Sonderform des Hämagglutinationstests stellt der Antihumanglobulin- bzw. Coombstest dar, bei dem Antihumanglobulin als Supplement zum Nachweis erythrozytärer Antikörper verwendet wird.

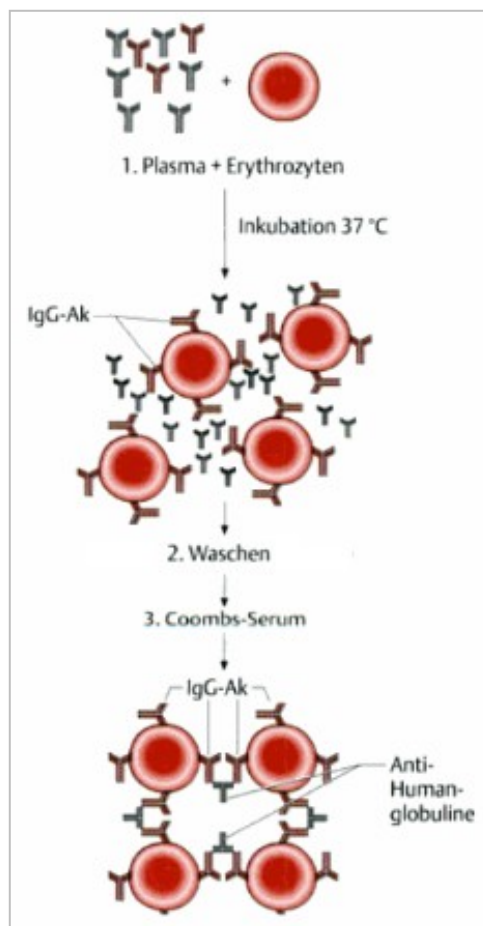
### **2.3.3 Antihumanglobulintest (Coombstest)**

Der Antihumanglobulintest (AGT) stellt einen Hämagglutinationstest dar, der dem Nachweis inkompletter Antikörper dient. Es werden zwei Formen unterschieden: der direkte und der indirekte Coombstest (Abbildung 3).

Beim direkten Coombstest werden inkomplette Antikörper nachgewiesen, welche *in vivo* an die Erythrozyten eines Patienten gebunden haben. Zudem lassen sich Komplementfaktoren wie z.B. C3d, welche nach Aktivierung des Komplementsystems an die Erythrozytenmembran gebunden haben, nachweisen. Als Untersuchungsmaterial dienen Patientenerythrozyten, die zunächst drei- bis viermal mit dem zehnfachen Volumen einer geeigneten Lösung wie NaCl gewaschen werden, damit Antikörper, die nicht an die Erythrozytenmembran gebunden sind, aus dem Testansatz entfernt werden. Anschließend erfolgt bei Raumtemperatur die Inkubation der Testerythrozyten mit einem Antihumanglobulinserum (AHG), welches gegen humane Immunglobuline und den Komplementfaktor C3d gerichtet ist. Als AHG kommen z. B. polyspezifisches Antiserum gegen IgG, IgM, IgA und C3d oder monospezifische Antikörper gegen die einzelnen Komponenten zum Einsatz. Die Antikörper des AHG binden die Antikörper auf den Erythrozyten und führen über die Bildung von Immunkomplexen zur Quervernetzung der Erythrozyten, was sich als sichtbare Agglutination darstellt. Der Ansatz muss nach der Inkubation mit AHG zur besseren Beurteilung zentrifugiert werden und wird anschließend

auf Agglutination und Hämolyse geprüft. Der direkte Coombstest wird u.a. zur Abklärung hämolytischer Anämien und Transfusionsreaktionen eingesetzt.

Der indirekte Coombstest dient dem Nachweis inkompletter Antikörper, die sich im Plasma bzw. Serum des Patienten befinden und nicht an Erythrozyten gebunden sind. Diese Antikörper können erst nach Bindung an die Erythrozyten nachgewiesen werden. Daher wird zunächst Patientenplasma oder -serum mit den darin enthaltenen Antikörpern bei 37 °C mit industriellen Testerythrozyten *in vitro* inkubiert. Anschließend erfolgen das Waschen, die Inkubation mit AHG, die Zentrifugation und die Beurteilung der Agglutination wie beim direkten Coombstest. Der indirekte Coombstest kommt beispielsweise im Rahmen der Kreuzprobe und des Suchtests auf irreguläre Antikörper zum Einsatz.



**Abbildung 3: Prinzip des Antihumanglobulintests (Coombs- Test) (Kretschmer et al. 2008)**

Beim direkten Coombstest laufen nur die Phasen zwei bis drei ab, beim indirekten Coombstest zusätzlich die Phase eins.

*Abkürzungen:* AK = Antikörper, IgG = Immunglobulin G

### **2.3.4 Methoden zum Nachweis erythrozytärer Antikörper**

Der Nachweis erythrozytärer Antikörper kann in einer Vielzahl von Testsystemen erfolgen. Zwei weit verbreitete Testsysteme sind der Röhrchentest und der Kartentest.

#### **2.3.4.1 Röhrchentest**

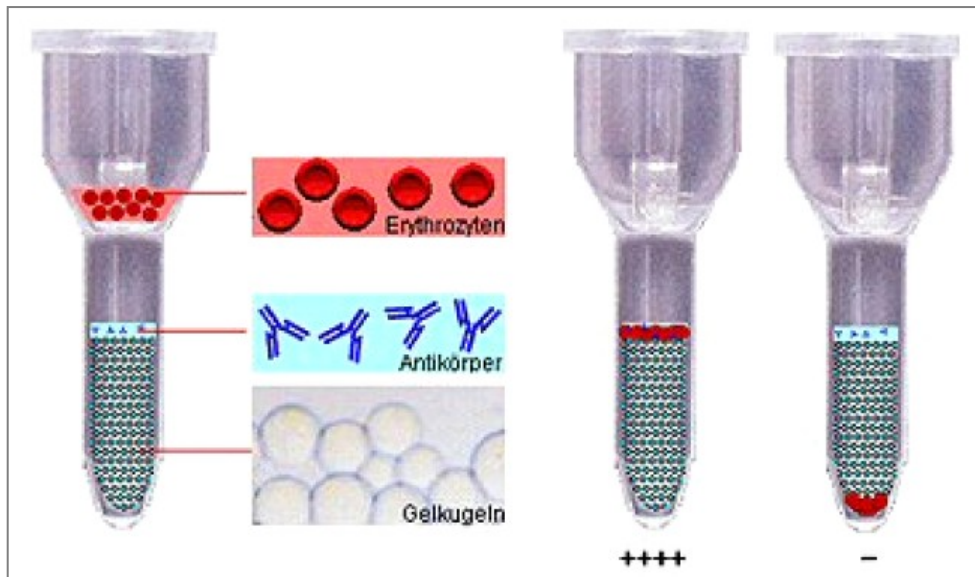
Beim Röhrchentest, auch als Röhrchenagglutinationsmethode bezeichnet, erfolgt die Durchführung des Tests in einfachen Glasröhrchen. Beim Coombstest werden beispielsweise ein bis zwei Tropfen AHG zu einem Tropfen sensibilisierter 3%iger Erythrozytensuspension in ein Reagenzglas gegeben und nach Durchmischung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation wird die Agglutination nach ein bis zwei und nach 15 Minuten über der Lichtplatte beurteilt.

#### **2.3.4.2 Gelkartentest**

Häufig werden heutzutage auch Kartentests eingesetzt. Bei diesen werden die agglutinierten bzw. nicht agglutinierten Erythrozyten anhand von Dichtegradienten und Mikropartikeln in sog. Mikrotitersäulen getrennt. Dies wird auch als Säulenagglutinationsmethode bezeichnet. Die eingesetzten Mikrotiterkarten bestehen aus sechs Kunststoffmikrotitersäulen (Abbildung 5). Diese Säulen sind je nach Hersteller mit Dichtegradientenflüssigkeit und/oder mit Mikropartikeln aus Gel oder Glas gefüllt. Die Mikropartikel befinden sich bei sog. Leerkarten in NaCl-Lösung, bei LISS-Karten in Lösungen niedriger Ionenstärke (LISS-Lösung) und bei Coombskarten in AHG mit spezifischen Antikörpern wie Anti-IgG, Anti-IgM, Anti-IgA und Anti-C3d. Entscheidend ist, dass das Säulenmaterial Poren besitzt, die nur von Einzelerythrozyten passiert werden können, während agglutinierte Erythrozyten die Säule nicht oder nur zum Teil passieren. Daher sedimentieren Testerythrozyten ohne gebundene Antikörper durch Zentrifugation zum Boden der Mikrotitersäulen (negative Agglutinationsreaktion), während mit Antikörpern beladene Erythrozyten je nach Stärke der Agglutinationsreaktion sichtbare Agglutinate innerhalb oder oberhalb der Mikropartikelschicht der Säule bilden (positive Agglutinationsreaktion). Die Abbildungen 4 und 5 zeigen Mikrotiterkarten mit verschiedenen starken Agglutinationsreaktionen. Waschvorgänge entfallen beim Einsatz von Kartensystemen, da nicht erythrozytär gebundene Antikörper nicht in die Befüllung der Karten eindringen können. Die Durchführung der Kartentests erfolgt stets nach Maßgabe des Kartenherstellers. Hierbei sind Erythrozyten, Patientenplasma oder -serum,

Mikrotiterkarten, Pipetten, Zentrifugen und die vom Hersteller zur Verfügung gestellten Diluenzien notwendig.

Ein etablierter Kartentest ist der Gelkartentest. Bei diesem Test erfolgt die Hämagglutination in Säulen, die mit Dextrangelkügelchen gefüllt sind (Abbildung 4). Gelkartentests kommen zur Blutgruppenbestimmung, beim direkten und indirekten Coombs-Test und beim Antikörpersuchtest zur Anwendung. Über den schlanken Gelsäulen befinden sich trichterförmige Reaktionskammern für das Untersuchungsmaterial (Patientenplasma, -serum, -erythrozyten) und zusätzlich benötigte Reagenzien. Über der Gelmatrix befinden sich die für die Agglutination benötigten Antikörper (beispielsweise Coombs-Serum oder spezifische Antikörper gegen Blutgruppenantigene). Für den Test wird das Untersuchungsmaterial in die Reaktionskammern pipettiert und anschließend nach Anweisung des Herstellers inkubiert und zentrifugiert. Dabei werden zu Beginn der Zentrifugation zunächst die Erythrozyten vom Plasma getrennt, danach erfolgt die Reaktion der Erythrozyten mit den in der Säule befindlichen Antikörpern. Agglutinierte Erythrozyten werden im Gel aufgehalten (positive Agglutinationsreaktion), während nicht agglutinierte Erythrozyten das Gel passieren und am Boden der Säule sedimentieren (negative Agglutinationsreaktion).



**Abbildung 4: Prinzip des Gelkartentests** (Copyright 2006: DiaMed AG, Cressier, Schweiz)

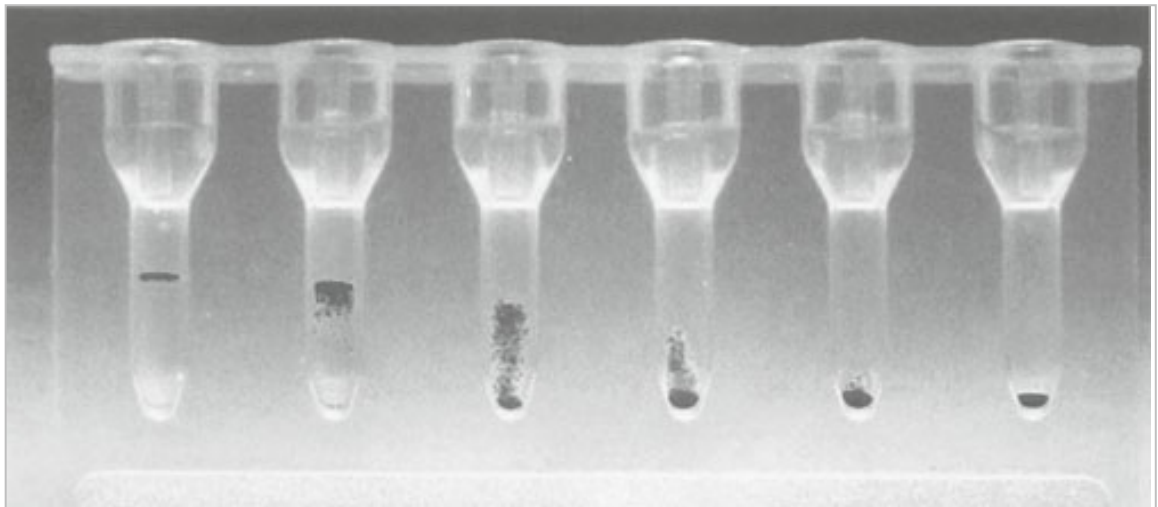
Links ist der schematische Aufbau einer Mikrotitersäule abgebildet, in die bereits Erythrozyten pipettiert wurden. Die Testantikörper (blau) sind gegen die im Plasma, Serum oder auf den Erythrozyten des Patienten gesuchten Antikörper oder Blutgruppenantigene gerichtet.

In der mittleren Säule ist eine sehr stark positive (++++ ) Agglutinationsreaktion dargestellt, in der rechten Säule ist eine negative (-) Reaktion zu sehen.

Der Agglutinationsgrad der Erythrozyten wird semiquantitativ wie folgt beurteilt (Abbildung 5):

- sehr stark positiv (++++): komplette Agglutination aller Zellen, keine freien Zellen sichtbar
- stark positiv (+++): hohe Anzahl großer Agglutinate
- deutlich positiv (++) : viele kleine und mittelgroße Agglutinate
- schwach positiv (+): kleine Agglutinate
- diskret positiv ([+]): wenige Mikroagglutinate
- negativ (-): keine Agglutinate

Vorteil des Kartentests gegenüber dem Röhrchentest ist die höhere Sensitivität, die Erfassung schwacher inkompletter Antikörper, das Entfallen von Waschvorgängen und die wiederholt mögliche Ablesbarkeit der Agglutinationsreaktion über mehrere Tage. Nachteil ist, dass vermehrt unspezifische Reaktionen erfasst werden.



**Abbildung 5: Verschiedene Grade der erythrozytären Agglutinationsreaktion bei einer Mikrotiterkarte mit sechs Säulen (Kiefel 2010)**

Die ersten vier Agglutinationsreaktionen sind positiv, da die agglutinierten Erythrozyten die Säulen nicht oder nur teilweise passieren. Die rechte Agglutinationsreaktion ist negativ, da die Erythrozyten vollständig zum Boden der Säule sedimentiert sind. Stärke der Agglutination von links nach rechts: sehr stark positiv (++++), stark positiv (+++), deutlich positiv (++) , schwach positiv (+), diskret positiv ([+]) bis negativ (-), negativ (-).

## **2.4 Therapeutische Hämapherese**

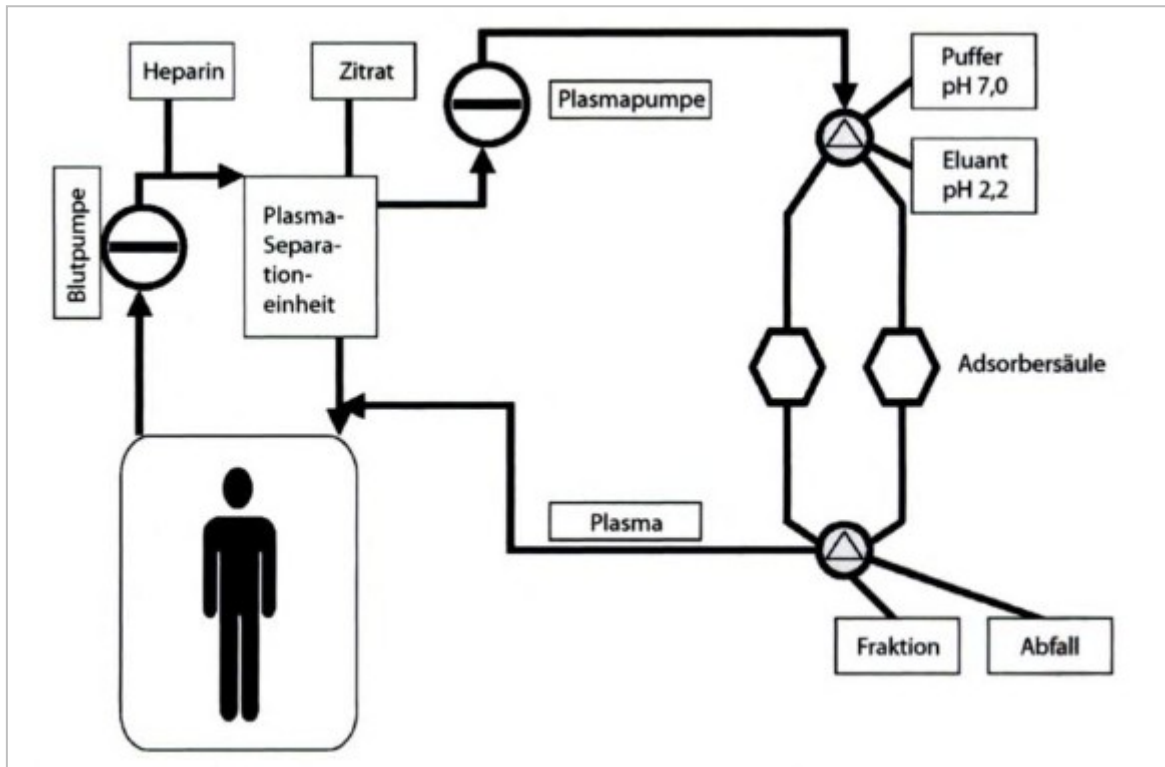
In zahlreichen Fachdisziplinen wie Neurologie, Hämatologie, Nephrologie und Rheumatologie wird heutzutage die therapeutische Hämapherese eingesetzt. Hierunter versteht man Therapieverfahren, bei denen zelluläre oder lösliche Bestandteile des Blutes, welche eine krankheitsauslösende oder -unterhaltende Wirkung haben, entfernt oder ausgetauscht werden (Kiefel 2010).

### **2.4.1 Therapeutische Immunadsorption**

Eine Form der Hämapherese stellt die therapeutische Immunadsorption (IA) dar. Hierbei handelt sich um ein extrakorporales Verfahren zur Entfernung spezifischer Proteine wie Antikörper oder Immunkomplexe aus dem Plasma eines Patienten (Abbildung 6). Die Eliminierung erfolgt im Rahmen einer sog. „Säulenaffinitätschromatografie“, indem die zu entfernenden Proteine an spezifische Liganden (Aminosäuren, Peptide, Proteine) oder spezifische Antigene oder Antikörper binden, welche an einer Säule immobilisiert sind. Je nach Art der eingesetzten Säule können Zielpathogene so hochspezifisch entfernt werden. Die Eliminationsrate der Antikörper und Immunkomplexe ist dabei von der Flussrate des Plasmas während der IA und dem insgesamt gereinigten Plasmavolumen abhängig.

Im Rahmen der IA wird einem Patienten zunächst Vollblut aus einer Vene entnommen und mit Hilfe eines Antikoagulans ungerinnbar gemacht. Hierfür werden im Normalfall die Kubitalvenen mit großlumigen Dialysenadeln punktiert. Zur Antikoagulation des Vollblutes dient als Mittel der ersten Wahl das Citrat ACD-A, welches dem Vollblut normalerweise im Verhältnis 1:12 zugesetzt wird. ACD-A bindet als Chelatbildner freies Kalzium, welches somit nicht mehr zur Aktivierung des Gerinnungssystems zur Verfügung steht. Alternativ kann Heparin allein oder in Kombination mit ACD-A zur Anwendung kommen. Die Blutflussrate während der IA beträgt normalerweise zwischen 60 und 120 ml/min, bei Bedarf sind Schwankungen zwischen 10 und 150 ml/min zulässig. Bei langsamen Blutflussraten sollte das Verhältnis von ACD-A zu Vollblut erhöht (z. B. 1:10), bei hohen Blutflussraten erniedrigt (z. B. 1:14) werden. Im Anschluss wird das antikoagulierte Vollblut mit Hilfe von Zellseparatoren oder Plasmafiltrationssystemen in seine zellulären und plasmatischen Bestandteile getrennt. Dies erfolgt in Zellseparatoren durch Zentrifugalkräfte je nach spezifischer Dichte der einzelnen Blutkomponenten. Bei kontinuierlichen Verfahren kann das Blut durch die Anlage von zwei Gefäßzugängen zeitgleich entnommen und retransfundiert werden. Bei Plasmafiltrationssystemen hingegen

wird das Vollblut unter Druck über synthetische, semipermeable Membranen geleitet, wobei das Plasma die Poren der Membran passiert, während die zellulären Bestandteile zurückgehalten werden. Vollblut und Plasma werden im extrakorporalen Kreislauf mit Hilfe spezieller Blut- bzw. Plasmapumpen unidirektional fortgeleitet.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung einer therapeutischen Immunadsorption unter Einsatz eines Adsorptionssäulenpaares (Berlit 2005)**

Die Antikoagulation erfolgt in diesem Schema mittels einer Kombination aus Citrat und Heparin. Als Plasmaseparationseinheit dienen Zellseparatoren oder Plasmafiltrationssysteme. Puffer und Eluant dienen der Regenerierung der Adsorbersäulen, sie werden nach Durchlaufen der Säulen im Abfallbeutel gesammelt. Im Fraktionsbeutel finden sich die eluierten Antikörper. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Fließrichtung des Blutes bzw. des Plasmas während der IA.

Das separierte Plasma des Patienten wird mit einem Fluss von 20 - 25 ml/min oder maximal 30 % des Blutflusses über verschiedene Säulen geleitet, sodass die zu entfernenden Antikörper oder Immunkomplexe spezifisch an ihre Liganden binden und hierdurch aus dem Plasma eliminiert werden. Die entfernten Antikörper werden in einem speziellen Fraktionsbeutel gesammelt. Handelt es sich um wiederverwendbare Säulen, werden die Antikörper oder Immunkomplexe mit Hilfe spezieller Lösungen (Eluant) von den Säulen eluiert, in einem Abfallbeutel gesammelt und nach der IA entsorgt. Nach Durchlaufen der Säule wird das gereinigte Plasma mit den zuvor separierten Blutbestandteilen wiedervereignet und dem Patienten anschließend über einen venösen



Zugang retransfundierte. Während der IA sollte der Plasmakalziumspiegel engmaschig kontrolliert werden. Tritt unter der IA eine Hypokalzämie auf, wird Kalzium substituiert. Dieses kann auch prophylaktisch per infusionem appliziert werden. Bei Einsatz von Heparin kann Protamin zur Antagonisierung verabreicht werden. Zur Entfernung von Antikörpern oder Immunkomplexen stehen verschiedene Säulensysteme zur Verfügung, welche die Proteine mit unterschiedlicher Spezifität und Effizienz binden. Zwei dieser Systeme sollen im Folgenden vorgestellt werden.

#### **2.4.1.1 Prinzip des *Immunosorba*®-Systems**

Beim *Immunosorba*®-System (Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland) ist der Ligand Staphylokokkenantigen A kovalent an eine unlösliche Sepharose-Trägermatrix gebunden und fungiert als stationäre Phase des Chromatografieverfahrens. Staphylokokkenantigen A ist ein bakterielles Zellwandprotein, welches spezifisch IgG1, IgG2 und IgG4 über deren Fc-Teil bindet. In geringerem Maße werden auch IgG3, IgA und IgM eliminiert. Vorteil des *Immunosorba*®-System ist die Regenerierbarkeit der Säulen, welche patientenspezifisch bis zu 20 Mal wiederverwendet werden können. Nachteilig ist jedoch, dass die Effizienz der Säulen mit steigender Anwendungszahl nachlässt. Die Säulen werden während der Behandlung als Paar eingesetzt. Während die erste Säule durch das darüber fließende Plasma mit Antikörpern beladen wird, erfolgt die Regenerierung der zweiten Säule durch Elution der gebundenen Antikörper oder Immunkomplexe mit Hilfe saurer Glycinlösung. Nach der IA können die Säulen durch die mitgelieferte Konservierungslösung gelagert werden. Die Bindungskapazität pro Säule beträgt bei vollständiger Sättigung ca. 1,25 g Immunglobulin. Damit ist eine Reduktion von IgG1 um 97 %, von IgG2 um 98 %, von IgG3 um 40 %, von IgG4 um 77 % sowie von IgM um 56 % und IgA um 55 % erreichbar. Albumin, Fibrinogen und Antithrombin werden um 40 % vermindert (Kiefel 2010). Das *Immunosorba*®-System wird unter anderem zur Behandlung der akuten humoralen Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation eingesetzt. Abbildung 7 zeigt eine handelsübliche *Immunosorba*®-Säule.



**Abbildung 7: Beispiel einer *Immunosorba*®-Säule** (Copyright 2005: Fresenius Medical Care GmbH, Bad Homburg, Deutschland)

#### **2.4.1.2 Prinzip des *Glycosorb*®-AB0-Systems**

Die *Glycosorb*®-AB0-Säulen (Glycorex Transplantation AB, Lund, Schweden) werden zur selektiven Eliminierung von Isoagglutininen eingesetzt. Andere Blutkomponenten wie Gerinnungsfaktoren, Immunglobuline und Albumin werden nicht signifikant reduziert. Hierbei sind die für das AB0-Blutgruppenantigen A bzw. B spezifischen terminalen Trisaccharide als Liganden an einer Sepharose-Trägermatrix immobilisiert. Es existieren sowohl Säulen für die Adsorption von Anti-A- als auch Anti-B-Isoagglutininen. Da die Säulen dampfsterilisiert sind und ohne Konservierungslösungen auskommen, kann nach der Benutzung die Sterilität der Säulen nicht mehr gewährleistet werden, weshalb diese nach Maßgabe des Herstellers nur für den Einmalgebrauch zugelassen sind. Die Lagerung der vier Monate haltbaren Säulen erfolgt bei 2 - 8 °C. Für Patienten bei denen die Anti-A-Isoagglutinine entfernt werden sollen, kommt die *Glycosorb*®-A-Säule zum Einsatz, für Patienten bei denen die Anti-B-Isoagglutinine entfernt werden sollen die *Glycosorb*®-B-Säule. Für Patienten der Blutgruppe AB ist bisher keine kombinierte Säule erhältlich. Die *Glycosorb*®-AB0-Säulen sind seit 2001 im klinischen Einsatz und dienen der spezifischen Elimination von Isoagglutininen im Rahmen AB0-inkompatibler Organtransplantationen. Sie wurden bisher bei Nieren-, Leber-, Pankreas-, Lungen-, Herz- und Stammzelltransplantationen verwendet. Je nach geplanter Transplantation und Höhe des Isoagglutinititers vor Behandlungsbeginn ist eine unterschiedliche Anzahl von IA zur Reduktion der Isoagglutinititer nötig. Abbildung 8 zeigt eine handelsübliche *Glycosorb*®-A-Säule.



**Abbildung 8: Beispiel einer Glycosorb®-A-Säule** (Copyright 2012: Glycorex Transplantation AB, Lund, Schweden)

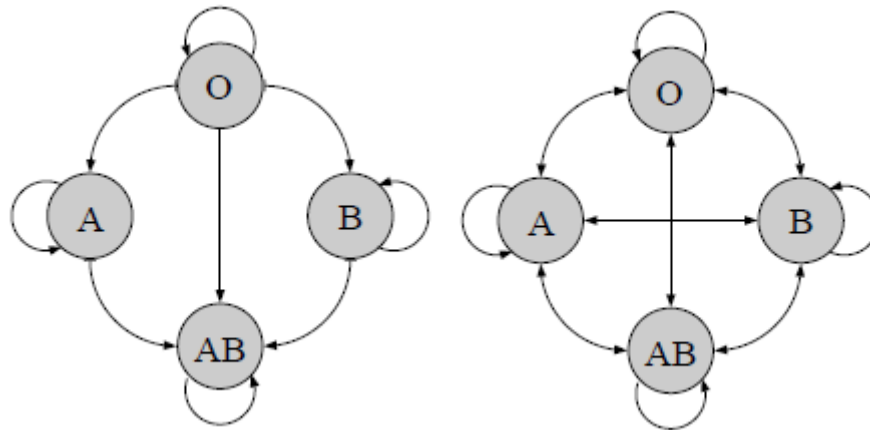
Obgleich die therapeutische Hämapherese heute in zahlreichen Fachdisziplinen zur Anwendung kommt, sollte die Indikation nach wie vor streng gestellt werden, da es sich um eine invasive und kostenintensive Therapieform handelt. Durch den extrakorporalen Kreislauf kann es zu hämodynamischen Belastungen des Patienten kommen. Blutdruck, Körpertemperatur, Elektrolythaushalt, Gerinnungssystem, onkotischer Druck und Osmolarität des Blutes werden negativ beeinflusst. Deshalb müssen Blutdruck, Blutbild, Elektrolythaushalt, Leber- und Nierenfunktionswerte, Gesamteiweiß und Gerinnungsstatus sorgfältig überwacht werden. Durch das Antikoagulans ACD-A kann es zu hypokalzämischen Nebenwirkungen wie Parästhesien, Tetanien und Hypotension kommen, durch die eingesetzten Substitutionslösungen zu allergischen bis anaphylaktischen Reaktionen. Da es sich bei den verschiedenen IA-Säulen zudem um kostenintensive und teilweise nur für den Einmalgebrauch konzipierte Adsorptionsmaterialien handelt, muss eine Apheresetherapie auch aus wirtschaftlicher Sicht abgewogen werden. Vor jeder therapeutischen Hämapherese muss daher eine individuelle Nutzen-Risiko-Abwägung für den Patienten evaluiert werden.

## **2.5 AB0-inkompatible Organtransplantationen**

### **2.5.1 AB0-inkompatible Lebendspenden**

Die Durchführung von Lebendspenden hat aufgrund der Knappheit postmortalen Organspenden, des stetig wachsenden Bedarfs an Spenderorganen und ihrer international akzeptablen Ergebnisse bezüglich Transplantat- und Patientenüberlebensrate in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. So konnte durch die Einführung von Nierenlebendspenden (LDK-Tx) und Leberlebendspenden (LDL-Tx) der Pool der Spenderorgane für Patienten mit terminalen Nieren- und Lebererkrankungen erweitert werden.

Laut der „Richtlinie für die Wartelistenführung und die Organvermittlung“ der Bundesärztekammer (§ 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG) wird für alle Organtransplantationen Kompatibilität im AB0-Blutgruppensystem gefordert. AB0-Inkompatibilität gilt als absolute Kontraindikation, da die präformierten Isoagglutinine eines Empfängers eine hyperakute Abstoßungsreaktion des Transplantats hervorrufen können. AB0-Inkompatibilität ist jedoch für bis zu 30% der Exklusionen bei Lebendspenden verantwortlich (Genberg et al. 2010), sodass die Zahl zur Verfügung stehender Organe von Lebendspendern durch die rechtlichen Vorgaben eingeschränkt wird. Aus diesem Grund gibt es seit geraumer Zeit weltweit Bestrebungen die immunologische Barriere des AB0-Blutgruppensystems im Rahmen von Transplantationen zu überwinden um mehr Lebendspenden zu ermöglichen (Abbildung 9). Studien der letzten Jahre haben bestätigt, dass sich die Kurzzeitergebnisse AB0-inkompatibler LDL-Tx deutlich gebessert haben (Egawa et al. 2011). Die Langzeitergebnisse AB0-kompatibler und inkompatibler LDK-Tx zeigen mittlerweile sogar keinen signifikanten Unterschied mehr (Takahashi et al. 2006). Dies weist darauf hin, dass AB0-inkompatible Lebendspenden zwar eine radikale und kostenintensive, aber auch effektive und sichere Behandlungsoption für Patienten mit Organbedarf darstellen. Im Mittelpunkt der Forschungen stehen hierbei vornehmlich die perioperative Reduktion der Isoagglutinititer des Empfängers zur Vermeidung hyperakuter Transplantatrejektionen sowie eine optimierte und intensiverte immunsuppressive Therapie zur Minimierung akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen.



**Abbildung 9: Mögliche Blutgruppenkonstellationen bei AB0-kompatibler (links) und AB0-inkompatibler (rechts) Organtransplantation im Vergleich**

### 2.5.1.1 AB0-inkompatible Nierenlebendspenden

Die ersten Nierentransplantationen (NTx) wurden in den 1950iger Jahren durchgeführt. Bereits 1955 wurde zum ersten Mal über eine postmortale NTx zwischen einem Spender der Blutgruppe B, Rh + und einem Empfänger der Blutgruppe O, Rh + berichtet (Hume et al. 1955). Da die AB0-inkompatibel transplantierte Niere jedoch nur kurzzeitig ihre Funktion aufnahm und am 17. postoperativen Tag wieder entfernt werden musste, entschieden sich die behandelnden Ärzte gegen die Empfehlung AB0-inkompatibler NTx. In anderen Kliniken wurden zum damaligen Zeitpunkt ähnliche Erfahrungen gesammelt. Mehrfach zeigten sich hyperakute Abstoßungsreaktionen nach AB0-inkompatibler NTx (Starzl et al. 1964). Im Jahre 1987 wurde die erste Fallstudie über 26 Patienten mit AB0-inkompatibler Nierenlebendspende (LDK-Tx) veröffentlicht, wobei sich schlechte Kurz- und Langzeitergebnisse bezüglich der Transplantatüberlebensrate zeigten (Alexandre et al. 1987). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von der Verwendung blutgruppeninkompatibler Organe in den meisten Transplantationszentren abgesehen.

Dies galt jedoch nicht für alle Zentren. Vor allem in Japan wurde die Entwicklung von Konzepten zur Durchführung AB0-inkompatibler Nierenlebendspenden (LDK-Tx) in den 1990iger Jahren stark vorangetrieben, da dort die Zahl postmortalen Organspenden aufgrund geringer Akzeptanz in der Bevölkerung von jeher stark limitiert ist und somit der Großteil der Spenderorgane aus Lebendspenden stammt. So konnte 1998 über hervorragende Kurz- und Langzeitergebnisse bezüglich Transplantat- und Patientenüberlebensraten bei 67 AB0-inkompatibler LDK-Tx berichtet werden (Tanabe et al. 1998). Als Reaktion auf die guten Resultate etablierten sich in westlichen Transplantationszentren ebenfalls Protokolle zur AB0-inkompatiblen LDK-Tx. Die

Transplantationsprotokolle wurden im Laufe der Jahre durch wachsende Expertise der verschiedenen Zentren kontinuierlich verändert und verbessert, sodass sich die Lang- und Kurzzeitergebnisse AB0-kompatibler und -inkompatibler Organe mittlerweile angenähert haben. So zeigten sich in einer 2006 erschienenen retrospektiven Studie mit 564 Patienten, die sich einer AB0-inkompatiblen LDK-Tx unterzogen, Patientenüberlebensraten von 94, 91, 88 und 81 % mit Transplantatüberlebensraten von 86, 82, 74 und 53 % nach einem, drei, fünf und zehn Jahren. In der zugehörigen Kontrollgruppe, bestehend aus 1055 Patienten mit AB0-kompatibler LDK-Tx, betrug die Patientenüberlebensrate 98, 97, 94 und 87 % und die Transplantatüberlebensrate 96, 89, 81 und 56 %. Nach sieben Jahren ließ sich für Patienten- und Transplantatüberlebensrate zwischen beiden Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied mehr nachweisen (Takahashi und Saito 2006). Diese Ergebnisse zeigen, dass AB0-inkompatible LDK-Tx eine bedeutsame Option für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz darstellen.

#### **2.5.1.2 AB0-inkompatible Leberlebendspende**

Heutzutage stellt auch die Leberlebendspende (LDL-Tx) aufgrund akzeptabler Resultate bezüglich Empfänger- und Transplantatüberlebensrate eine Standardmethode für die Behandlung terminaler Lebererkrankungen dar (Ikegami et al. 2007). Ähnlich wie bei der Nierenlebendspende führt AB0-Inkompatibilität jedoch auch hier zu einer Vielzahl von Exklusionen möglicher Spender. Um der steigenden Organknappheit entgegenzuwirken, wird daher seit einigen Jahren auch an der optimierten Durchführung AB0-inkompatibler LDL-Tx intensiv geforscht.

Bereits bei Einführung der Lebertransplantation (LTx) in den 1960iger Jahren wurden die ersten postmortalen Spenderorgane AB0-inkompatibel verpflanzt, da Blutgruppeninkompatibilität zu dieser Zeit keine Kontraindikation für Organtransplantationen darstellte (Raut und Uemoto 2011). Ende der 1970iger Jahre wurde erstmals in einer retrospektiven Fallstudie über elf AB0-inkompatible LTx mit postmortalen Spenderorganen berichtet (Starzl et al. 1979). Obwohl zwei Transplantate versagten und explantiert werden mussten, ließ sich histopathologisch kein Hinweis auf eine Transplantatrejektion durch Isoagglutinine oder andere Antikörper nachweisen. Starzl et al. vermuteten, dass die Leber gegen hyperakute, antikörpervermittelte Abstoßungsreaktionen resistenter als andere Organe sei und bezeichneten sie als privilegiertes Organ. Somit schienen LTx auch über die Grenzen des AB0-

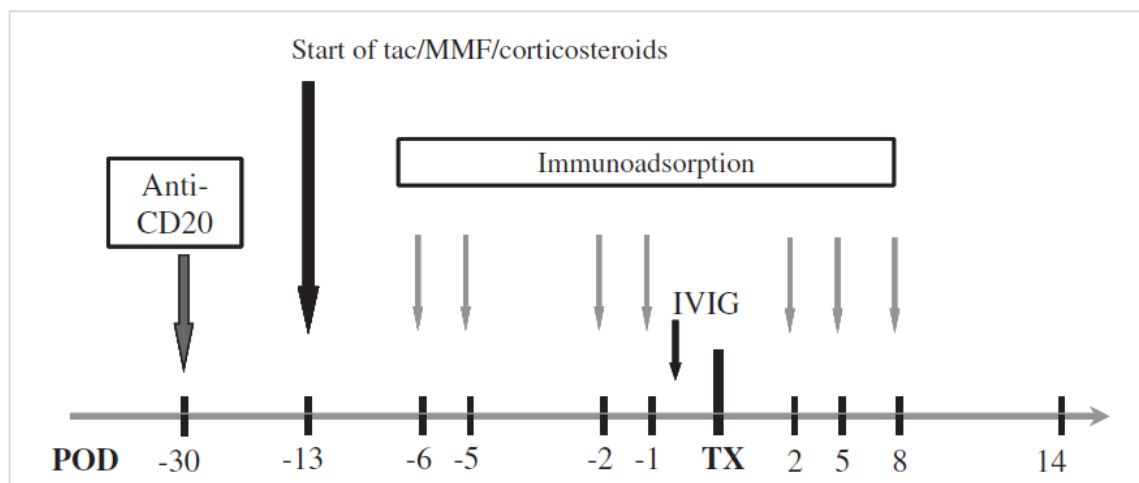
Blutgruppensystems hinweg möglich. Einige Jahre später wurde dieser Status jedoch in Frage gestellt als über die ersten hyperakuten Abstoßungsreaktionen nach AB0-inkompatibler LTx berichtet wurde (Rego et al. 1987). Zudem wurde deutlich gemacht, dass die Transplantatfunktionsrate bei AB0-identischer LTx signifikant besser als bei AB0-kompatibler oder -inkompatibler LTx war (Gordon et al. 1986). Als Ursache für die hyperakuten Abstoßungsreaktionen und die verminderte Transplantatfunktionsrate wurden antikörpervermittelte Rejektionen (AMR) (Gugenheim et al. 1990) postuliert. Es wurde eine erhöhte Inzidenz an Cholangitiden, biliären Leckagen, zellulären Rejektionen und arteriellen Thrombosen bei AB0-inkompatibler LTx nachgewiesen (Sanchez-Urdazpal et al. 1991), welche auch durch verstärkte immunsuppressive Therapieschemata häufig nicht beherrschbar waren (Farges et al. 1995). Aufgrund der hohen Rate an Komplikationen, des hohen Risikos von AMR und schlechter Lang- und Kurzzeitergebnissen wurden AB0-inkompatible LTx daher lange Zeit gemieden.

Dies änderte sich erst wieder durch die steigende Zahl von Lebendleberspenden (LDL-Tx), die sich seit den 1990er Jahren als Alternative zur Postmortalspende etablierten. Diese haben in den letzten Jahren vor allem in Japan erheblich an Bedeutung gewonnen, da postmortale Organspenden dort auch heute noch so gut wie keine Rolle spielen (Kaido und Uemoto 2010). Da es durch AB0-Inkompatibilität jedoch häufig zu Lebendspenderexklusionen kam, war auch hier die Einführung AB0-inkompatibler LDL-Tx unausweichlich. Die japanischen Transplantationszentren entwickelten innovative Therapieprotokolle zur Konditionierung der Patienten, die anschließend auch von westlichen Zentren übernommen, adaptiert und weiterentwickelt wurden. Es wurde erkannt, dass der Erfolg AB0-inkompatibler LDL-Tx wie bei der LDL-Tx von der perioperativen Reduktion der Isoagglutinine des Patienten und einer intensivierten immunsuppressiven Therapie abhängig ist. So konnte vor wenigen Jahren in einer Studie mit 291 Patienten bereits eine 3-Jahres-Überlebensrate von 61% und eine 5-Jahres-Überlebensrate von 52% bei erwachsenen Patienten mit AB0-inkompatibler LDL-Tx erreicht werden (Egawa et al. 2008). Somit lässt sich schlussfolgern, dass auch die AB0-inkompatible LDL-Tx für Patienten mit terminaler Lebererkrankung eine neue, in Erwägung zu ziehende Behandlungsoption darstellt.

## 2.6 Perioperative Konditionierung bei AB0-inkompatibler Lebendspende

Das AB0-System stellt das wichtigste Histokompatibilitätssystem bei soliden Organtransplantationen dar (Rydberg 2001). Grund ist die Expression der AB0-Antigene auf den Organen des Körpers sowie die Existenz der Isoagglutinine. Binden die Isoagglutinine an ihr jeweiliges Antigen kann es zur Aktivierung des Komplementsystems, zu Thrombozytenaggregation, Inflammation und vaskulärer Thrombose kommen. Dies äußert sich als hyperakute, verzögert hyperakute, akute humorale (vaskuläre) oder akute zelluläre Transplantatrejektion (Toma 1994). Folge ist in den meisten Fällen der Verlust des Organs.

Ziel ist daher die Empfänger eines AB0-inkompatiblen Organs so zu konditionieren, dass keine Abstoßungsreaktionen auftreten. Im Mittelpunkt der derzeitigen Konditionierungsprotokolle stehen daher sowohl die Entfernung der präformierten Isoagglutinine als auch die Verhinderung des Wiederanstiegs der Isoagglutintiter. Hierfür kommt die therapeutische Hämapherese in Kombination mit einer optimierten immunsuppressiven Therapie zum Einsatz (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Beispiel eines Konditionierungsprotokolls bei AB0-inkompatibler Nierenlebenspende unter Einsatz antigenspezifischer Immunoabsorption und Rituximab (Genberg et al. 2010)**

Zahlen stehen für den prä- bzw. postoperativen Tag in Bezug zum Tag der Transplantation, die hellgrauen Pfeile geben den Zeitpunkt der Immunoabsorptionsbehandlungen an.

*Abkürzungen:* Anti-CD20 = *Rituximab*, IVIG = intravenöse Immunglobuline, MMF = Mycophenolat mofetil, POD = präoperativer Tag, tac = Tacrolimus, Tx = Zeitpunkt der Transplantation.



### 2.6.1 Reduktion der Isoagglutinititer des Empfängers

Früh wurde erkannt, dass die perioperative Reduktion der Isoagglutinititer des Empfängers eine Grundvoraussetzung für die Durchführung AB0-inkompatibler Transplantationen ist (Slapak et al. 1990). Der präoperative Zieltiter für die Isoagglutinine liegt bei Nieren- und Lebendleberspende je nach Transplantationszentrum zwischen  $\leq 1:4$  und  $\leq 1:16$ . Im Einzelfall können nach individueller Abwägung auch Patienten mit höherem Isoagglutinititer transplantiert werden (Shimmura et al. 2000). Die nachhaltige Reduktion der Isoagglutinititer im Patientenplasma kann dabei auf mehrere Arten bewerkstelligt werden.

Einerseits wird das Patientenplasma von den darin enthaltenen Isoagglutininen befreit, indem es mit Hilfe der therapeutischen Hämapherese entweder ausgetauscht oder durch Säulenaffinitätschromatografie gereinigt wird. Dies wird entweder durch perioperativen Therapeutischen Plasmaaustausch (TPA) mit Plasma der Blutgruppe AB, Doppelfiltrationsapherese (DFPP) oder durch IA mit *Glycosorb®-AB0-Säulen* oder Protein-A-Säulen realisiert. Entscheidend ist hierbei vor allem das engmaschige Monitoring der Isoagglutinititer, welche vor und nach jeder Hämapherese bestimmt werden sollten. Anzahl, Häufigkeit und Art der Hämapherese sind dabei vom klinikinternen Konditionierungsprotokoll abhängig.

Andererseits muss die Neusynthese der Isoagglutinine unterdrückt werden. In vielen Zentren wird daher zum Zeitpunkt der Transplantation eine Splenektomie durchgeführt, da der Milz eine Bedeutung bei der Reifung der B-Zellen (Raut und Uemoto 2011) und der Synthese der Isoagglutinine zugeschrieben wird (Salamon et al. 1985). Als Alternative zur Splenektomie wird heute bereits in vielen Fällen der monoklonale Anti-CD20-Antikörper *Rituximab* präoperativ eingesetzt. Dieser führt durch B-Zell-Depletion zur Reduktion der Antikörperproduktion, gleichzeitig sollen die chirurgischen und immunologischen Komplikationen, die mit einer Splenektomie einhergehen, vermieden werden. *Rituximab* ist dabei in der Lage die B-Zellen bis zu ein Jahr zu depletieren (Sawada et al. 2002) und bis zu zwei Jahre zu supprimieren (Jordan et al. 2011).

Einige Transplantationsprotokolle beinhalten außerdem die perioperative Applikation von IVIG, die einerseits zur Suppression der B-Zell-Antwort durch Fc-Rezeptor-abhängige B-Zell-Apoptose und andererseits zur Inhibition der Komplement- und T-Zell-vermittelten Transplantatschädigung führen (Raut und Uemoto 2011). Zudem können durch IVIG infektiöse Komplikationen vermieden werden (Renner et al. 2010).

### 2.6.2 Immunsuppressive Therapie des Empfängers

Um die erhöhte Gefahr akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen bei AB0-inkompatibler Tx zu minimieren, kommt ein intensiviertes immunsuppressives Regime zur Anwendung. Die Immunsuppression wird vor der geplanten Tx begonnen und meist als Tripel- oder Quadrupeltherapie durchgeführt, wobei jedes Transplantationszentrum ein eigenes Protokoll verfolgt. Bewährt haben sich Kombinationen aus Glucocorticoiden, Tacrolimus, Mycophenolat mofetil, Ciclosporin, Azathioprin, Antilymphozytenglobulin, Deoxyspergualin und Cyclophosphamid. Auch die Applikation monoklonaler Antikörper kann Bestandteil der intensivierten Immunsuppressionstherapie sein. Zum Einsatz kommen neben *Rituximab* andere monoklonale Antikörper wie der Anti-CD3-Rezeptorantikörper *Muromonab-CD3* und die Anti-CD25- Antikörper *Basiliximab* und *Daclizumab* (Rydberg 2001). Durch diese Antikörper werden die Aktivierung der T-Zellen, die T-Zell-Proliferation und somit auch die T-Zell-abhängige Immunantwort gehemmt.

Da bei AB0-inkompatiblen LDL-Tx ein erhöhtes Risiko von Transplantat- und Portalvenenthrombosen besteht, wird bei diesen zusätzlich eine lokale Infusionstherapie praktiziert. Hierfür werden die Arteria hepatica propria und ihre Äste mehrere Tage über einen intravaskulären Katheter mit Methylprednisolon sowie Prostaglandin E1 und Gabexat-Mesilat gespült (Kim et al. 2008). Prostaglandin E1 fungiert als Vasodilatator und Plättchenaggregationshemmer, Gabexat-Mesilat hemmt als Proteaseinhibitor ebenfalls die Plättchenaggregation und die plasmatischen Gerinnungsfaktoren. In Kombination mit dem Immunsuppressivum Methylprednisolon wird so das Risiko von Transplantat- und Portalvenenthrombosen reduziert.

### 3 Ziele

Im Rahmen von Organtransplantationen hat die Durchführung von Lebendspenden aufgrund der Knappheit postmortaler Organspenden und des stetig wachsenden Organbedarfs an Bedeutung gewonnen. Dabei führt die Inkompatibilität im AB0-Blutgruppensystem in bis zu 30 % der Fälle zum Ausschluss potenzieller Lebendspender. Grund sind die präformierten Isoagglutinine des Empfängers, die über Aktivierung des Komplementsystems zu Thrombozytenaggregation, Inflammation und vaskulärer Thrombose des Transplantats und somit zu einer hyperakuten Abstoßungsreaktion führen. Um die immunologische Barriere des AB0-Blutgruppensystems im Rahmen dieser Lebendspenden zu überwinden, wurden in den letzten Jahren spezielle Konditionierungsprotokolle entwickelt. In deren Mittelpunkt stehen die perioperative Eliminierung und nachhaltige Supprimierung der Isoagglutinine des Empfängers mittels therapeutischer Hämapherese und intensivierter Immunsuppression. In Jena wird zur Isoagglutinineliminierung vor AB0-inkompatibler Tx eine Immunadsorptionsbehandlung mit Hilfe der isoagglutininspezifischen *Glycosorb®-AB0-Säulen* durchgeführt. Diese Säulen sollen eine Isoagglutinineliminierung auf den präoperativen Zieltiter ermöglichen, ohne dass andere wichtige Plasmaproteine verloren gehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es anhand eines AB0-inkompatibel transplantierten Patientenkollektivs die Effektivität der Isoagglutinititerreduktion bei Verwendung der *Glycosorb®-AB0-Säulen* zu evaluieren. Die erreichte Titerreduktion wurde anschließend mit der Titerreduktion eines Kontrollkollektivs verglichen, das mit dem nicht-isoagglutininspezifischen *Immunosorba®-System* behandelt worden war. Dabei standen folgende Fragestellungen im Mittelpunkt der Untersuchungen:

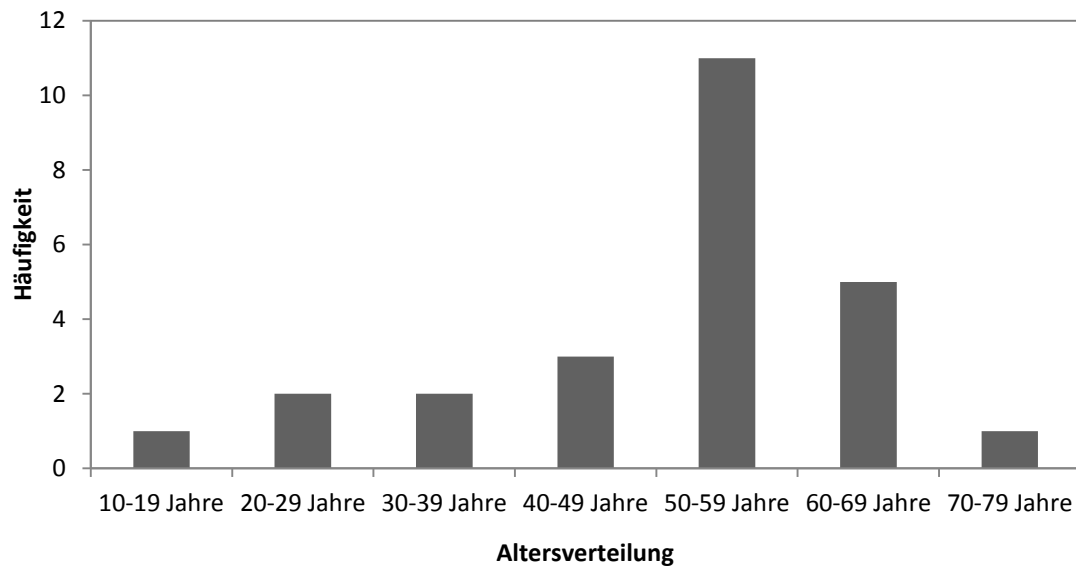
1. Wie hoch und wie effektiv ist die Isoagglutinititerreduktion beider Säulen im Vergleich? Wie verhalten sich die Isoagglutinititer zwischen den IA?
2. Besteht bei Verwendung der Säulen ein Zusammenhang zwischen der erreichten Isoagglutinititerreduktion und der Menge des behandelten Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens?
3. Benötigen Patienten mit hohem Ausgangstiter mehr Immunadsorptionen als Patienten mit normalem Ausgangstiter?

Die Bearbeitung dieser Fragen trägt dazu bei herauszuarbeiten, ob die Verwendung der kostenintensiven *Glycosorb®-AB0-Säulen* im Rahmen AB0-inkompatibler Organtransplantationen gerechtfertigt ist oder ob mit dem *Immunosorba®-System* eine kostengünstigere und vergleichbare gute Alternative zur Verfügung steht. Darüber hinaus liefern die Ergebnisse zu diesen Fragen wertvolle Hinweise, welches Plasmavolumen während einer IA optimal prozessiert werden sollte und ob für Patienten mit hohen Ausgangstitern mehr IA eingeplant werden müssen. Die Ergebnisse helfen somit ein möglichst schonendes und kosteneffizientes Konditionierungsprotokoll für AB0-inkompatible Organtransplantationen zu entwickeln.

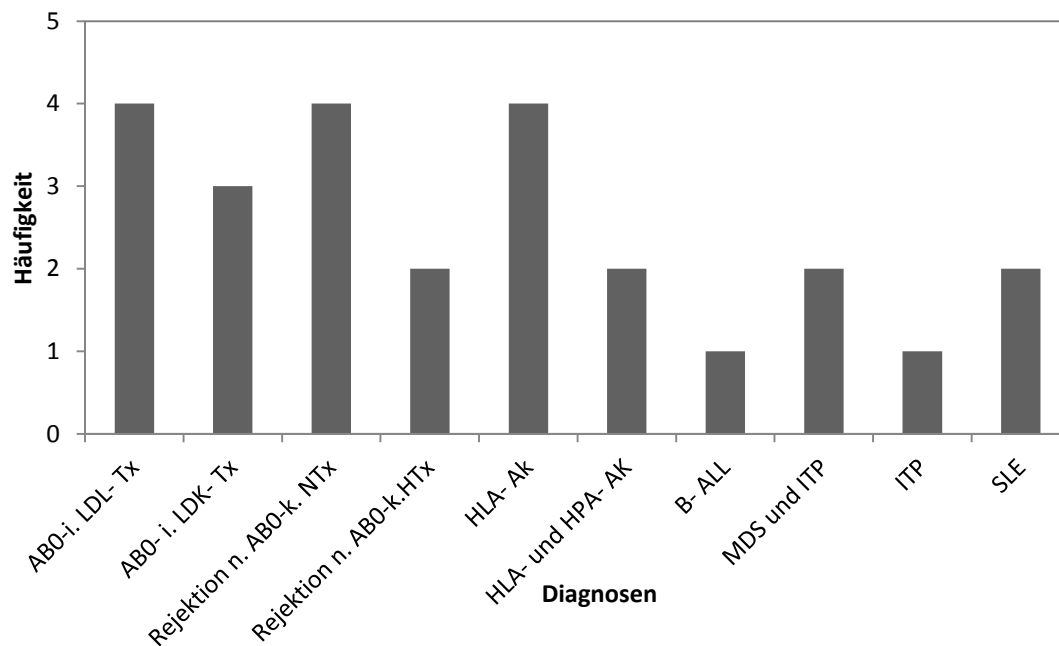
## 4 Patienten und Methoden

### 4.1 Patienten

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Reduktion der Isoagglutinititer von 25 Patienten untersucht, die sich aus verschiedenen Gründen einer Immunadsorptionstherapie in der Therapeutischen Hämapherese des Instituts für Transfusionsmedizin der FSU Jena unterzogen. Zur Datengewinnung wurde das Archiv des Instituts nach den Patientenakten der letzten Jahre durchgesehen. Alle Daten wurden anonymisiert. Es handelte sich um 13 männliche und 12 weibliche Patienten. Das Alter der Patienten lag zwischen 18 und 71 Jahren mit einem Durchschnitt von 50,6 Jahren (Mittelwert) und 55,0 Jahren (Median) bei einer Standardabweichung von 13,8 Jahren. Der Behandlungszeitraum erstreckte sich auf eine Zeitspanne zwischen 3 und 86 Tagen mit einem Durchschnitt von  $15,0 \pm 17,2$  Behandlungstagen. Die Patienten wurden für diese Arbeit nach verschiedenen Kriterien ausgewählt. Dabei erfolgte die Einteilung der Patienten nach Grunderkrankung/Diagnose bzw. geplanter Operation, sodass die 25 Patienten in vier Diagnosegruppen eingeteilt werden konnten (Tabelle 2, Tabelle 3). Die Diagnosen wurden hierbei von den Mitarbeitern der Kliniken für Innere Medizin, Herz- und Thoraxchirurgie, Viszeralchirurgie, Urologie und des Institutes für Transfusionsmedizin gestellt und begründeten sich auf Anamnese, klinischen Symptomen, Labordiagnostik sowie apparativer Diagnostik. Des Weiteren teilte die Art des bei der IA verwendeten Säulensystems die untersuchten Patienten in zwei zusätzliche Gruppen: Sieben Patienten (Patientenkollektiv, Gruppe 1) wurden mit den *Glycosorb®-AB0-Säulen* behandelt, 18 Patienten (Kontrollkollektiv, Gruppen 2 bis 4) mit dem *Immunosorba®-System*. Eine Übersicht über die Altersverteilung und Diagnosen der Patienten geben die Abbildungen 11 und 12.



**Abbildung 11: Altersverteilung der einzelnen Patienten**



**Abbildung 12: Darstellung der Patientendiagnosen**

*Abkürzungen:* ABO-i. = ABO- inkompatibel, n. = nach, ABO-k. = ABO- kompatibel, LDL-Tx = Lebendleberspende, LDK-Tx = Lebendnierenspende, NTx = Nierentransplantation, HTx = Herztransplantation, HLA-AK = Antikörper gegen das humane Leukozytenantigensystem, HPA-AK = humane Plättchenantikörper, B-ALL = Akute lymphatische Leukämie der B-Zellreihe, ITP = Immunthrombozytopenie, SLE = Systemischer Lupus erythematodes

#### 4.1.1 Patientenkollektiv

Zunächst wurden sieben Patienten untersucht, die sich im Zeitraum Februar 2008 bis März 2010 im Rahmen des Konditionierungsprotokolls vor geplanter AB0-inkompatibler Organtransplantation am UKJ mehrfach therapeutischen IA unterziehen mussten. Diese Patienten wurden zur Gruppe 1 zusammengefasst. Bei drei Patienten war eine AB0-inkompatible LDK-Tx und bei vier Patienten eine AB0-inkompatible LDL-Tx geplant. Die gespendeten Organe stammten von den Ehepartnern, Geschwistern oder Kindern der Patienten. Im Rahmen des Protokolls wurden alle Patienten vor und nach der Tx mehrfach mit IA unter Verwendung von *Glycosorb®-AB0-Säulen* behandelt. Nur vier der konditionierten Patienten konnten letztlich AB0-inkompatibel transplantiert werden. Bei drei Patienten konnte die Operation aus folgenden Gründen nicht durchgeführt werden: Eine Patientin mit geplanter LDK-Tx erreichte den präoperativen Isoagglutininzieltiter von  $\leq 1:4$  nicht, ein Patient mit geplanter LDL-Tx erhielt vorzeitig eine Kadaverspende von Eurotransplant und bei einer Patientin mit geplanter LDL-Tx musste diese aufgrund intraoperativ entdeckter Peritonealkarzinose abgebrochen werden. Charakteristika des Patientenkollektivs sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

**Tabelle 2: Übersicht der wichtigsten Charakteristika des Patientenkollektivs (Gruppe 1)**

<b>Anzahl der Patienten</b>	7
<b>Alter (Jahre)</b>	
- Mittelwert	57,0 ± 5,0
- Median	57,0
<b>Geschlecht</b>	
- Männlich	4
- Weiblich	3
<b>Diagnosen</b>	
- Klatskintumor	1
- Exogen-toxische Leberzirrhose	2
- Hepatozelluläres Karzinom	1
- Terminale Niereninsuffizienz bei diabetischer Nephropathie	3
<b>AB0-Blutgruppen der Patienten (Organempfänger)</b>	
- A	2
- B	1
- 0	4
<b>AB0-Blutgruppenkonstellation Spender → Empfänger</b>	
- A → 0	4
- B → A	2
- A → B	1

#### 4.1.2 Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv setzte sich auch 18 Patienten zusammen, die aufgrund verschiedener Grunderkrankungen ebenfalls mehrfach mit IA behandelt wurden (Tabelle 3). Während dieser Behandlungen kamen *Immunosorba®-Säulen* zum Einsatz. Das Alter des gesamten Kontrollkollektivs lag bei einer Standardabweichung von 15,4 Jahren bei 48,1 (Mittelwert) und 53,0 (Median) Jahren. Um den Verlauf der Isoagglutinititer der 18 Patienten mit denen der AB0-inkompatibel transplantierten Patienten vergleichen zu können, wurde das Kontrollkollektiv in drei Untergruppen unterteilt. Diese gliederten sich wie folgt:

- Gruppe 2: sechs Patienten, die aufgrund einer Abstoßungsreaktion nach AB0-kompatibler Organtransplantation behandelt wurden
- Gruppe 3: sechs Patienten, die aufgrund irregulärer Antikörper (HLA-Antikörper, HPA-Antikörper) im Plasma behandelt wurden
- Gruppe 4: sechs Patienten, die aufgrund einer hämatologischen oder autoimmunen Grunderkrankung behandelt wurden

**Tabelle 3: Übersicht der wichtigsten Charakteristika des Kontrollkollektivs (Gruppe 2-4)**

	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
<b>Anzahl der Patienten</b>	6	6	6
<b>Alter (Jahre)</b>			
- Mittelwert	42,5 ± 17,4	48,8 ± 13,1	53,0 ± 16,1
- Median	45,5	53,0	56,0
<b>Geschlecht</b>			
- Männlich	6	-	3
- Weiblich	-	6	3
<b>Diagnosen</b>			
- Rejektion nach NTx	4	-	-
- Rejektion nach HTx	2	-	-
- HLA-AK	-	4	-
- HLA- und HPA-AK	-	2	-
- B-ALL	-	-	1
- MDS + ITP	-	-	2
- SLE	-	-	1
- ITP	-	-	2
<b>AB0-Blutgruppe</b>			
- A	4	-	1
- B	1	1	-
- 0	1	5	5



#### **4.1.3 Erfassung der Patientenparameter**

Alle Daten stammen aus dem Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Jena. Im Archiv der Abteilung Therapeutische Apherese findet die Aufbewahrung der Patientenakten inklusive der Anamnesebögen, Behandlungsprotokolle, Dokumente der Transfusionsmedizin sowie Mikrobiologie statt. Für das Patientenkollektiv wurde neben den Initialen (erst Vor-, dann Nachname) Geburtsdatum, Geschlecht, Grunderkrankung/Diagnose, Blutgruppe, Datum der Tx sowie das Alter des Patienten bei Tx notiert. Auch die Initialen, Geschlecht, Geburtsdatum und Blutgruppe der Lebendspender wurden notiert. Weiterhin wurden 18 Patienten des Kontrollkollektivs entsprechend oben genannter Parameter untersucht. Für alle 25 Patienten erfolgte die Erfassung des prä- und posttherapeutischen Isoagglutinititers, welcher durch die Abnahme einer Blutprobe unmittelbar vor und nach jeder IA bestimmt werden konnte. Alle Daten wurden in einer Excel'07 Tabelle dokumentiert. Nach Verfügbarkeit und Vollständigkeit der Daten konnte der Zeitraum zwischen Juni 2006 und März 2010 eingegrenzt werden.

#### **4.1.4 Erfassung der Behandlungsparameter**

Die Dokumentation umfasste des Weiteren die Anzahl und die Daten der durchgeführten IA sowie die Art der dabei verwendeten Immunadsorptionssäule. Vor jeder IA wurden Körpergewicht, Körpergröße und Hämatokritwert des Patienten erfasst. Darüber hinaus wurde das während der IA behandelte Plasmavolumen, das daraus rechnerisch ermittelte Hämatokrit-korrigierte Plasmavolumen, die Dauer jeder IA, der Blutfluss während der IA, das Verhältnis des Antikoagulans ACD-A zu Vollblut sowie etwaige während der Behandlung aufgetretene Nebenwirkungen notiert. Erhielt ein Patient während der IA EK, TK oder FFP, fand die Dokumentation anhand von Konservennummer und Blutgruppe statt. Das gleiche galt auch für IVIG, welche die Patienten in Form von *Octagam*® (Octapharma GmbH, Langenfeld, Deutschland) oder *Gamunex*® (Talecris Biotherapeutics, Durham, USA) erhielten. Auch die Applikation von *Rituximab* (MabThera®, Roche, Freiburg, Deutschland), *Jonosteril*® (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) oder Humanalbumin 20% (Octapharma AG, Lachen, Schweiz) wurde berücksichtigt.

## 4.2 Material und Geräte

### 4.2.1 Geräte

Folgende Geräte und technische Hilfsmittel wurden verwendet:

Gerät	Hersteller/ Vertreiber
Cobe®Spectra-Apheresesystem	CaridianBCT®, Lakewood, CO, USA
Citem10®-Monitor	Excorim KB, Lund, Schweden
ID-Centrifuge 24 S	DiaMed, Cressier, Schweiz
ID-Incubator 37 S I	DiaMed, Cressier, Schweiz
DiaCent-CW	DiaMed, Cressier, Schweiz

### 4.2.2 Säulensysteme

Folgende zwei Säulensysteme kamen im Rahmen der IA zur Anwendung:

<i>Glycosorb AB0-Columns®</i>	Glycorex Transplantation AB, Lund, Schweden
<i>Immunosorba-Säulen®</i>	Fresenius Medical Care GmbH, Bad Homburg, Deutschland

### 4.2.3 Einmalartikel

Disposable Tubing Set (für <i>Cobe®Spectra</i> )	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Disposable Tubing Set (für <i>Citem10®- Monitor</i> )	CaridianBCT®, Lakewood, CO, USA
Blutentnahmeröhrchen - mit Kalium-EDTA 9 ml	Sarstedt-Monovetten, Nümbrecht, Deutschland
- mit Gerinnungsaktivator 9 ml	Sarstedt-Monovetten, Nümbrecht, Deutschland

Pipetten, Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
---	---------------------------------------

#### **4.2.4 Material zur Bestimmung der Isoagglutinintiter**

Referencells® A1, A2, B, 0	IMMUCOR, Rödermark, Deutschland
IgG/C3d- LISS/Coombs-ID-Card	DiaMed, Cressier, Schweiz
ID-Diluent 2	DiaMed, Cressier, Schweiz
Polystyrolröhrchen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Reagenzröhrchen, Reagenzgläser	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
NaCl	

#### **4.2.5 Gewinnung und Verarbeitung der Proben zur Bestimmung der Isoagglutinintiter**

Die zur Bestimmung der Isoagglutinintiter benötigten Blutproben wurden im Zeitraum Juni 2006 bis März 2010 unmittelbar vor Beginn und nach Ende jeder IA des Patienten abgenommen. Als Testmaterial dienten 5 bis 10 ml Serum oder Plasma, welches durch die Zentrifugation der Blutproben über 10 min bei 2500 g aus dem Vollblut gewonnen wurde. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Isoagglutinintiters in der Blutbank des Instituts für Transfusionsmedizin gemäß der institutsinternen SOP-Vorschriften.

Für Gruppe 1 erfolgte die Bestimmung durch die Medizinisch-technischen Assistenten des Instituts für Transfusionsmedizin mit anschließender Dokumentation in Form eines speziellen transfusionsmedizinischen Formulars in der Akte des Patienten sowie in der EDV und im Serologiebuch des Instituts.

Für die Gruppen 2 bis 4 wurden bei -80 °C tiefgefrorene und archivierte Serum- bzw. Plasmaproben aus den Tiefkühlschränken des Instituts anhand einer Liste mit den Namen der Patienten ausgewählt und anschließend selbstständig anhand der SOP-Vorschrift bestimmt.

## 4.3 Methoden

### 4.3.1 Vorgehensweise bei Aufnahme der Patienten

Als Voraussetzung für AB0- inkompatible Organtransplantationen (LDL-Tx, LDK-Tx) am Universitätsklinikum Jena gelten grundsätzlich einerseits die vollständige Evaluation von Spender und Empfänger hinsichtlich der körperlichen und psychischen Eignung zur Lebendspende sowie andererseits ein positives Votum der Ethikkommission der Landesärztekammer Thüringen.

Die Aufnahme der Patienten erfolgte gemäß der Grunderkrankung auf die entsprechenden Stationen der Kliniken für Innere Medizin, Herz- und Thoraxchirurgie, Viszeralchirurgie, und Urologie. Dort erfolgten ausführliche Gespräche über die Diagnose und eine detaillierte Aufklärung über die anstehende Therapie. Die Entscheidung zur therapeutischen Hämapherese wurde von den behandelnden Ärzten in Rücksprache mit den Kollegen der Transfusionsmedizin getroffen. Für jede IA wurde ein Behandlungstag festgelegt und die Patienten wurden an diesem in die Abteilung Therapeutische Hämapherese des Instituts für Transfusionsmedizin gebracht. Hier fand erneut eine detaillierte Aufklärung über Art und Ablauf der IA statt. Zudem wurden eine Anamnese und eine körperliche Untersuchung durchgeführt. Vor und nach den IA wurde venöses Vollblut zur Bestimmung des ionisierten Kalziumwertes sowie zur Messung der prä- und posttherapeutischen Antikörpertiter entnommen. Die Patienten gaben hierzu ihr schriftliches Einverständnis. Blutbild, Elektrolyt-, Nieren- und Leberwerte konnten im klinikumsinternen Laborprogramm eingesehen werden.

### 4.3.2 Immunadsorptionsbehandlung

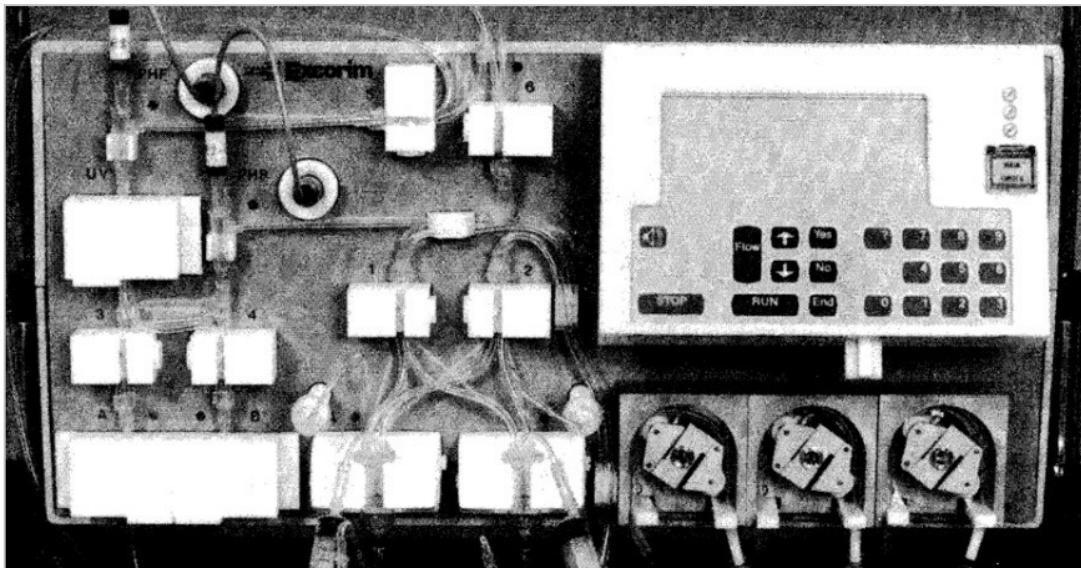
Für die Patienten der Gruppe 1 wurden *Glycosorb®-AB0-Säulen* (Glycorex Transplantation AB, Lund, Schweden) eingesetzt. Pro IA kam eine Säule zur Anwendung, welche entsprechend der zu entfernenden Isoagglutinine ausgewählt wurde. Eine Regeneration fand nicht statt. Die Anzahl und Frequenz der perioperativ durchgeführten IA richtete sich nach der Höhe des Isoagglutinititers. Der prä- und postoperative Isoagglutininzieltiter wurde dabei auf  $\leq 1:4$  sowohl für die AB0- inkompatible LDL- Tx als auch für die LDK-Tx festgelegt.

Für die Patienten der Gruppe 2 bis 4 wurden *Immunosorba®-Säulen* (Fresenius Medical Care GmbH, Bad Homburg, Deutschland) eingesetzt, welche als Paar verwendet und durch

Regeneration wiederverwendet wurden. Die Anzahl und Frequenz der IA richtete sich ebenfalls nach Höhe der zu entfernenden Antikörpertiter bzw. nach dem klinischem Verlauf der Grunderkrankung.

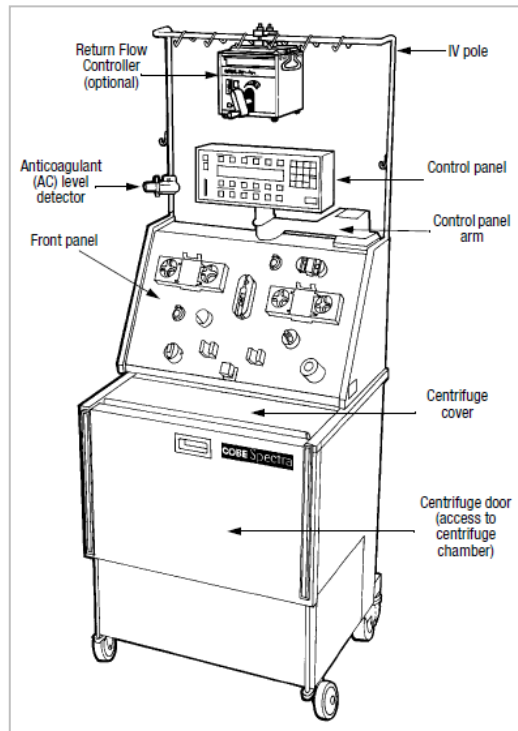
#### 4.3.3 Behandlungsablauf

Die Immunadsorptionsbehandlungen der Patienten wurden mit Hilfe des Adsorptions-Desorptions-Automaten *Citem10®-Monitor* (Excorim KB, Lund, Schweden) und des Zellseparators *Cobe® Spectra-Apheresesystem* (CaridianBCT®, Lakewood, CO, USA) durchgeführt (Abbildung 13, Abbildung 14).

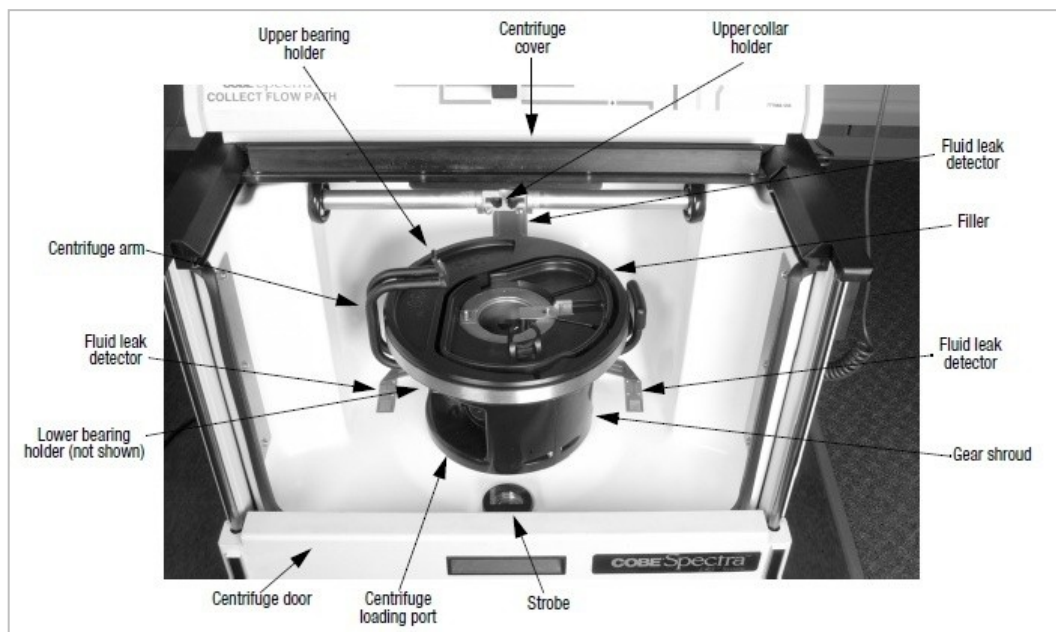


**Abbildung 13: Der Adsorptions-Desorptionsautomat *Citem®10-Monitor* zur Steuerung der Immunadsorptionsbehandlung (Shapiro et al. 1990)**

Zunächst wurde über einen großvolumigen kubitalen Gefäßzugang mittels Venenverweil- oder Shaldonkatheter venöses Vollblut mit einer Flussrate von 28 bis 55 ml/min über ein Einwegslauchsystem (*Disposable Tubing Set*, CaridianBCT®, Lakewood, CO, USA) in die Zentrifugationskammer des Zellseparator geleitet und dort durch Dichtegradientenzentrifugation in Plasma und zelluläre Bestandteile getrennt (Abbildung 14, Abbildung 15).



**Abbildung 14: Schematische Darstellung eines *Cobe® Spectra*-Apheresesystems** (aus: GAMBRO BCT. 2005. COBE®Spectra™ Apheresis System, Essentials Guide, GAMBRO BCT)



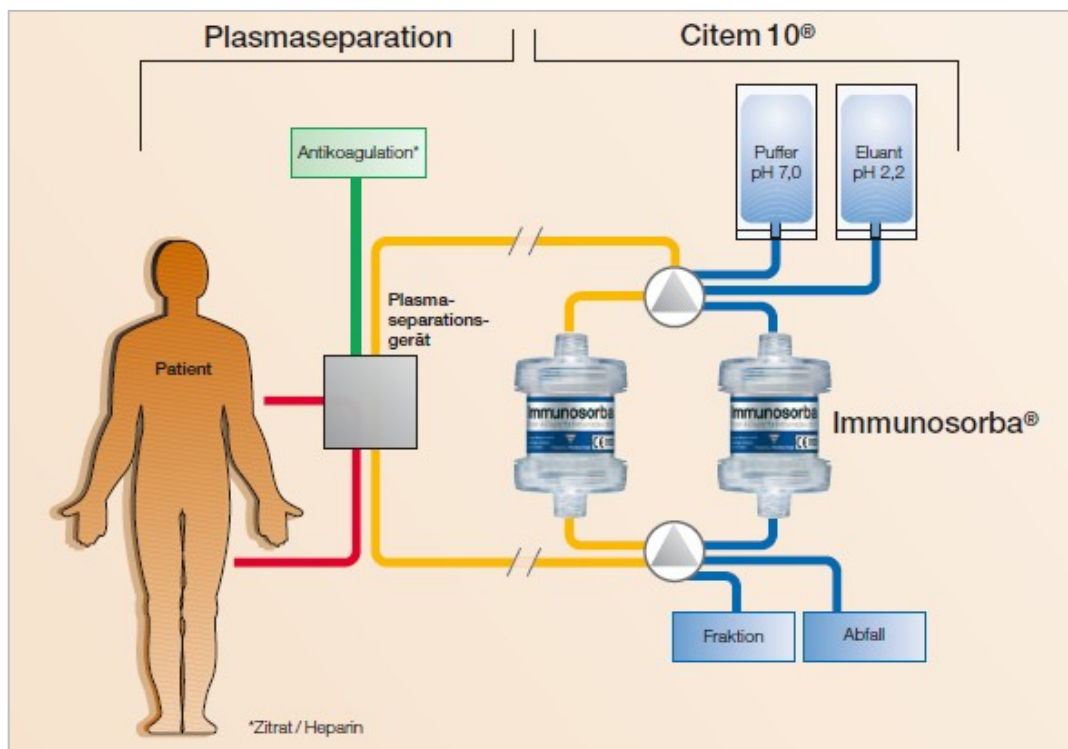
**Abbildung 15: Darstellung der Zentrifugationskammer des *Cobe® Spectra*- Apheresesystems** (Copyright 2005: GAMBRO BCT. 2005. COBE®Spectra™ Apheresis System, Essentials Guide, GAMBRO BCT)

Die Antikoagulation, welche über den Zellseparator steuerbar ist, erfolgte in allen Fällen mit dem Antikoagulans ACD-A mit einer Infusionsrate zwischen 1,8 und 3,0 ml/min. Durch die Eingabe von Geschlecht, Körpergewicht, Körpergröße und Hämatokrit in den

Monitor des Zellseparators kann dieser die Flussrate über die Blut- und Plasmapumpen und das Verhältnis von Antikoagulans zu Vollblut automatisch berechnen und anzeigen. Manuelle Änderungen der Parameter sind jederzeit möglich. Basierend auf der unterschiedlichen Dichte der Blutbestandteile sammeln sich die Erythrozyten am äußeren und das Plasma am inneren Rand der Kammer, während der „Buffy coat“ aus Leukozyten und Thrombozyten dazwischen liegt. Nach der Plasmaseparation wird das Plasma über ein zweites Einwegschlauchsystem (*Disposable Tubing Set*, Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland) zum Citem10®-Monitor geleitet, der die extrakorporale Elimination der zu entfernenden Substanzen steuert. Er leitet das Plasma ins jeweilige Säulensystem, sodass beim Durchdringen der Sepharosematrix die zu entfernenden Isoagglutinine bzw. Antikörper und Immunkomplexe durch die spezifischen Liganden adsorbiert werden. Es können beliebig viele Adsorptionszyklen durchgeführt und somit die gewünschten Antikörperreduktionsraten erreicht werden. Der *Citem10®-Monitor* überwacht zudem kontinuierlich den pH-Wert des behandelten Plasmas um die Patientensicherheit zu gewährleisten. Durch die Messung der optischen Dichte der durch das System strömenden Flüssigkeiten entscheidet er, ob sie jeweils dem Plasma, dem Abfallbeutel oder dem Fraktionsbeutel zuzuführen sind. Die entfernten Antikörper gelangen in den Fraktionsbeutel und stehen somit für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Da die maximale Flussrate durch die Säulen nach Maßgabe des Herstellers 50 ml/min nicht überschreiten sollte, wurde das Patientenplasma in allen Fällen mit einer maximalen Geschwindigkeit von 25 ml/min über die Immunadsorptionssäulen geleitet. Das gereinigte Plasma wird einem Doppelbeutel zugeführt, aus dem der Zellseparator das Plasma entnimmt, es auf Körpertemperatur erwärmt und mit den zellulären Blutbestandteilen wiedervereinigt. Die Rückführung des gereinigten Vollblutes zum Patienten erfolgt im kontinuierlichen Verfahren über einen zweiten venösen Zugang am anderen Arm oder ein anderes Lumen des Katheters am selben Arm. Die Behandlungsdauer hing bei den untersuchten Patienten vom prozessierten Plasmavolumen ab. In drei Fällen musste eine bereits begonnene IA aus folgenden Gründen vorzeitig abgebrochen werden: Abfall des Hämoglobinwertes bei aktiver gastrointestinaler Blutung, innere Unruhe des Patienten mit Hinweis auf Myokardischämie im EKG sowie Erbrechen des Patienten und Applikation von 10 g IVIG unmittelbar vor Therapiebeginn. In einem Fall wurde die IA aufgrund von Erschöpfung des Patienten und Durchfall verkürzt. In drei weiteren IA traten bei den Patienten Nebenwirkungen auf: Fieber, Citratnebenwirkungen

in Form von Parästhesien, Kribbeln, Hitzewallungen, Wärmegefühl sowie Juckreiz bei Verdacht auf allergische Reaktion.

Da beim *Immunosorba®-System* eine alternierende Regeneration der Säulen stattfindet, wird nach Ablauf eines Behandlungszyklus der Plasmafluss durch den *Citem10®-Monitor* auf die jeweils andere Säule umgeleitet, woraufhin die erste Säule nach entsprechender Voreinstellung automatisch einer Regeneration unterzogen wird (Abbildung 16). Die Regeneration der Säulen erfolgt durch Spülung mit den mitgelieferten Lösungen (alle Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland). Zunächst werden die Säulen mit 1000 ml Puffer (pH 7,0) gespült um sie von Restplasma zu reinigen, anschließend erfolgt die Elution der Antikörper durch 1000 ml saurer Glycinlösung (pH 2,2). Nach der Elution wird die Säule zur Neutralisierung erneut mit 1000 ml Puffer gespült. Die Aufbewahrung der *Immunosorba®-Säulen* erfolgt zwischen zwei IA nach Regenerierung in Dunkelheit bei 2 - 8 °C in 250 ml der mitgelieferten Konservierungslösung. Diese enthält 0,04 % Polyhexamethylen-Biguanid (PHMB) als aktive Komponente. Vor jeder neuen Behandlung muss das Konservierungsmittel daher mit mindestens 1000 ml Puffers entfernt werden.



**Abbildung 16: Schematische Darstellung einer Immunadsorption mit Hilfe des *Immunosorba®*-Systems** (Copyright 2005 Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland)



#### **4.3.4 Jenaer Konditionierungsprotokoll für die AB0-inkompatible**

##### **Nierenlebendspende**

Das Jenaer Konditionierungsprotokoll leitete sich vom Freiburger Protokoll für AB0-inkompatible LDK-Tx ab (Donauer et al. 2006). Am Tag -28 vor Tx wurde tagesstationär einmalig 375 mg/m<sup>2</sup> Rituximab (*Mabthera*®, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen) intravenös appliziert. Das immunsuppressive Tripel-Induktionsregime aus den oralen Medikamenten Tacrolimus (*Prograf*®, Astellas Pharma GmbH, München, Deutschland), Mycophenolat Mofetil (*CellCept*®, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen) und Prednisolon wurde am Tag -7 vor Transplantation gestartet. Am Tag -3 wurden IVIG (*Octagam*®, Octapharma GmbH, Langenfeld, Deutschland oder *Gamunex*®, Talecris Biotherapeutics, Durham, USA) in einer Dosis von 0,5 g/kg KG appliziert. Zusätzliche intravenöse Prednisolonapplikationen erfolgten an den Tagen 0 (OP-Tag) und +1. Zur Entlassung wurde die immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil und Prednisolon fortgesetzt.

Zur perioperativen Reduktion der Isoagglutinintiter waren protokollgemäß an den Tagen -6, -5, -2, -1 vor sowie +3, +6, +9 nach Transplantation IA geplant. Der präoperative Isoagglutininzieltiter wurde auf  $\leq 1:4$  festgelegt. Die Bestimmung des Isoagglutinintiters erfolgte regelhaft vor und nach jeder IA. Bei noch nicht erreichtem Zieltiter konnten nach individueller Abwägung zusätzliche IA angesetzt, bei postoperativ niedrigen Werten anstehende IA weggelassen werden. Die antibiotische Infektionsprophylaxe wurde mit Valganciclovir, Fluconazol und Cotrimoxazol per os ab Tag 0 geführt.

Zusätzlich wurden standardmäßig Nierenbiopsien an den Tagen +3, +5, +7, +14, +90 und +365 durchgeführt.

#### **4.3.5 Jenaer Konditionierungsprotokoll für die AB0- inkompatible**

##### **Leberlebendspende**

Nach stationärer Aufnahme des Patienten wurde am Tag -7 vor Tx zunächst die immunsuppressive Medikation als Quadrupel-Induktionsregime mit Basiliximab (*Simulect*®, Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland), Prednisolon, Tacrolimus (*Prograf*®, Astellas Pharma GmbH, München, Deutschland) und Mycophenolat Mofetil (*CellCept*®, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen) gestartet. Zur Entlassung wurde die immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus, Mycophenolat-Mofetil und Prednisolon weitergeführt. IVIG (*Octagam*®, Octapharma GmbH, Langenfeld, Deutschland oder

*Gamunex®*, Talecris Biotherapeutics, Durham, USA) wurden am Tag -3 in einer Dosis von 0,5 g/kg Körpergewicht appliziert.

Zur Reduktion der Isoagglutinine waren präoperativ drei bis vier IA geplant, welche nach Möglichkeit täglich oder umtäglich bis zur Erreichung des präoperativen Isoagglutininzieltiters von  $\leq 1:4$  durchgeführt wurden. Anzahl und Frequenz der IA folgten keinem starren Regime, sondern richteten sich nach Höhe der Isoagglutinititer sowie klinischer Toleranz der Therapie durch den Patienten. Die letzte IA erfolgte planmäßig am Tag -1 vor Tx. Postoperativ wurden ab Tag 0 bzw. +1 IA durchgeführt, wobei sich auch hier Anzahl und Frequenz nach Höhe der postoperativen Isoagglutinititer mit Zieltiter  $\leq 1:4$  richteten. Die perioperative Messung der Isoagglutinititer erfolgte vor und nach jeder IA sowie zwischen den IA täglich. Eine antibiotische Infektionsprophylaxe wurde ebenfalls mit Valganciclovir, Fluconazol und Cotrimoxazol per os ab Tag 0 durchgeführt.

#### **4.3.6 Bestimmung der Isoagglutinititer**

Zum Nachweis der Isoagglutinititer musste die Patientenblutgruppe bekannt sein. Diese war in der Krankenakte des Patienten dokumentiert. Die Bestimmung der Isoagglutinititer erfolgte im Rahmen dieser Dissertation auf zwei verschiedene Arten: Einerseits mit Hilfe des Röhrchentests (RT), der wenig sensitiv für IgG-Isoagglutinine ist und überwiegend IgM-Isoagglutinine nachweist. Andererseits durch Anwendung eines Gelkartentest (GKT), wobei es sich um einen indirekten Coombstest zur Bestimmung der IgG-Isoagglutinititer handelt. Alle Plasma- bzw. Serumproben wurden mit Hilfe von Testerythrozyten auf Anti-A1, -A2 und -B-Isoagglutinine untersucht. Dabei wurden Erythrozyten der Blutgruppe 0 als Negativkontrolle mitgeführt. Je nach Blutgruppe des Patienten mussten dabei für jeden der beiden Tests ein Ansatz (Blutgruppe A), zwei (Blutgruppe B) oder drei (Blutgruppe 0) Ansätze mit linearer Verdünnungsreihe hergestellt werden.

##### **4.3.6.1 Herstellung einer linearen Verdünnungsreihe**

1. Zunächst wird eine lineare Verdünnungsreihe der Serum- bzw. Plasmaproben hergestellt. Hierfür werden sieben Glasröhrchen wie folgt fortlaufend beschriftet: 1:1 (unverdünnt), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 und 1:64.
2. In das zweite bis siebte Röhrchen werden nun für den RT jeweils 100  $\mu$ l und für den GKT 200  $\mu$ L NaCl pipettiert.

3. Anschließend werden in das erste und zweite Röhrchen für den RT jeweils 100 µl und für den GKT 200 µL Patientenserum oder -plasma zugefügt.
4. Die lineare Verdünnungsreihe wird hergestellt indem aus dem Gemisch des zweiten Röhrchens 100 µl (RT) bzw. 200 µL (GKT) in das dritte Röhrchen pipettiert werden, dann aus dem Gemisch des dritten Röhrchens 100 µl (RT) bzw. 200 µL (GKT) in das vierte Röhrchen usw.

#### **4.3.6.2 Röhrchentest**

1. In die Ansätze eins bis sechs der Verdünnungsreihe werden 100 µl Testerythrozyten (Referencells® A1, A2, B, 0, IMMUCOR, Rödermark, Deutschland) pipettiert. Die zu verwendenden Testerythrozyten richten sich nach Blutgruppe des Patienten und Art der gesuchten Isoagglutinine (Tabelle 4). Das siebte Röhrchen dient dem bedarfsmäßigen Ansatz weiterer Titerstufen bei Isoagglutinintitern > 1:32 und wird nicht mit Testerythrozyten gefüllt.
2. Die Ansätze werden leicht gemischt und dann bei Raumtemperatur zehn Minuten inkubiert. Anschließend erfolgt zur Verstärkung der Agglutinationsreaktion eine Zentrifugation bei 800 U/min für eine Minute in der DiaCent-CW-Zentrifuge (DiaMed, Cressier, Schweiz).
3. Zur Beurteilung der Isoagglutinintiterstufe werden die Glasröhrchen anschließend leicht aufgeschüttelt und über der Lichtplatte beurteilt.
4. Die letzte Titerstufe, bei der im Glasröhrchen noch eine deutliche Agglutinationsreaktion sichtbar ist, entspricht der Höhe des Isoagglutinintiters des Patienten.

#### **4.3.6.3 Gelkartentest**

1. Herstellung einer linearen Verdünnungsreihe für den GKT wie oben beschrieben. Das siebte Röhrchen wird zur Herstellung weiterer Titerstufen bei Isoagglutinintitern > 1:32 belassen.
2. Je nach Blutgruppe werden ein bis drei IgG/C3d-LISS/Coombs-ID-Cards (DiaMed, Cressier, Schweiz) fortlaufend mit 1:1 (unverdünnt), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 und 1:64 beschriftet.
3. In alle sechs Kavitäten werden 50 µl der benötigten Testerythrozyten pipettiert (Tabelle 4). Es wurde eine 5 %ige ID-Diluent-2-Suspension (DiaMed, Cressier,

Schweiz) der Testerythrozyten (Referencells® A1, A2, B, 0, IMMUCOR, Rödermark, Deutschland) verwendet, welche von den Medizinisch-technischen Assistenten des Instituts nach einmaligem Auswaschen der Erythrozyten mit NaCl hergestellt worden war.

4. Anschließend werden jeweils 25 µl des linear verdünnten Patientenserums/-plasmas in die Kavitäten pipettiert.
5. Die Karten werden 15 Minuten bei 37 °C im ID-Incubator 37 S I inkubiert und für 10 Minuten bei 4000 U/min in der ID-Centrifuge 24 S (beide DiaMed, Cressier, Schweiz) zentrifugiert.
6. Die Beurteilung erfolgt über der Lichtplatte. Dabei entspricht der Isoagglutinititer des Patienten der niedrigsten Verdünnungsstufe, die noch zu einer schwach positiven (+) Agglutination führt. Diese Verdünnungsstufe wird als Isoagglutinititer des Patienten dokumentiert.

**Tabelle 4: Schema zur Auswahl der zu verwendenden Testerythrozyten**

AB0-Blutgruppe des Patienten	Gesuchte Isoagglutinine	Testerythrozyten
A	Anti- B	B
B	Anti-A1, -A2	A1, A2
0	Anti-A1, -A2, -B	A1, A2, B

#### 4.3.7 Verwendete Formeln

##### 4.3.7.1 Hämatokrit-korrigiertes Plasmavolumen

Das behandelte Hämatokrit-korrigierte Plasmavolumen (PV<sub>Hct</sub>) in Litern wurde für jede IA mit Hilfe der Formel nach Kaplan (Kaplan 1990) berechnet. Hierfür sind Hämatokritwert und Körpergewicht des Patienten vor IA sowie das während der IA behandelte Plasmavolumen ausschlaggebend.

$$PV_{Hct} (L) = \frac{\text{behandeltes Plasmavolumen (L)}}{0,065 * \text{Körpergewicht (kg)} * (1 - \text{Hämatokrit (\%)})}$$

##### 4.3.7.2 Bestimmung der Titerreduktionsrate

Die Titerreduktionsrate (TRR) eines Patienten berechnete sich aus den jeweiligen Anti-A1, Anti-A2- und Anti-B-Isoagglutinititern sowie der Anzahl durchgeführter IA (Wilpert et al. 2007). Eine TRR von  $\geq 1,0$  wurde hierbei als effizient betrachtet. Zur Berechnung der

TRR wurden die Isoagglutinititer wie folgt ausgedrückt: Ein Titer von 1:1 entspricht Stufe 1, ein Titer von 1:2 entspricht Stufe 2, 1:4 entspricht Stufe 3, 1:8 entspricht Stufe 4 usw.

**Gruppe 1:**

$$\text{TRR} = \frac{(\text{Titerstufe vor 1. IA}) - (\text{Titerstufe vor AB0 – inkompatibler Tx})}{\text{Gesamtzahl der IA vor Tx}}$$

**Gruppe 2 bis 4:**

$$\text{TRR} = \frac{(\text{Titerstufe vor 1. IA}) - (\text{Titerstufe nach letzter IA})}{\text{Gesamtzahl der IA}}$$

**4.3.7.3 Intra treatment titer drop und Average titer drop**

Als „*intra treatment titer drop*“ (TD) wird die innerhalb einer IA erwünschte Reduktion eines Isoagglutinins um x Titerstufen bezeichnet (Wilpert et al. 2007). Für jedes Isoagglutinin lässt sich der Mittelwert aus den TD aller Patienten innerhalb einer IA, der „*average titer drop*“ (aTD), berechnen.

**Durchschnittliche Isoagglutinititerreduktion**

In einigen Fällen wurde zur Auswertung der Daten die durchschnittliche Isoagglutinititerreduktion innerhalb einer IA verwendet:

*Durchschnittliche Isoagglutinititerreduktion einer IA =*

- für Blutgruppe 0:  $\bar{x}$  (Isoagglutinititerreduktion Anti-A1 + A2 + B)
- für Blutgruppe B:  $\bar{x}$  (Isoagglutinititerreduktion Anti-A1 + A2)
- für Blutgruppe A:  $\bar{x}$  = Isoagglutinititerreduktion Anti- B

Zusätzlich wurde der Mittelwert der durchschnittlichen Isoagglutinititerreduktionen berechnet. Dabei setzte sich die Berechnung aus den Werten aller Patienten für eine IA zusammen.

*Mittelwert der durchschnittlichen Isoagglutinititerreduktion einer IA =*

$\bar{x}$  (mittlere Isoagglutinititerreduktion aller 25 Patienten)

**4.3.7.4 Titer increment und Average titer increment**

Das „*titer increment*“ (TI) bezeichnet den Wiederanstieg der Isoagglutinine zwischen zwei aufeinander folgenden IA. Für jedes Isoagglutinin lässt sich so der Mittelwert aus den TI aller Patienten innerhalb einer IA, das „*average titer increment*“ (aTI), berechnen. Ein aTI von > 2,0 Titerstufen wird als hoher „Titerrebound“ angesehen (Wilpert et al. 2007).

## 4.4 Statistik

### 4.4.1 Art der Auswertung

Mit Hilfe von Excel'07 wurde eine Tabelle für die Patientengruppen erstellt. Diese Daten wurden in das Computerprogramm „Statistical Package for Social Sciences“ (SPSS Inc., Chicago, USA) Version 18.0 importiert und ein entsprechendes Tabellenlayout entworfen. Die nachfolgende Datenanalyse erfolgte die mit freundlicher Unterstützung des Institutes für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der FSU Jena.

Zunächst wurde eine deskriptive Statistik der dokumentierten Parameter durch Berechnung der entsprechenden arithmetischen Mittelwerte, der Mediane, der Minima und Maxima sowie der Standardabweichung erstellt. Zur Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen behandeltem Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumen und Isoagglutinin-titerreduktion erfolgte eine Korrelationsanalyse mittels Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman. Der Einfluss des behandelten Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens auf die Isoagglutinin-titerreduktion wurde zudem mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests näher untersucht. Zur Beurteilung von Effektivitätsunterschieden innerhalb der drei gebildeten Plasmagruppen hinsichtlich Signifikanzen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Mit Hilfe der Berechnung von Quotenverhältnissen (Odds-Ratio) sollte ermittelt werden in welcher der untersuchten Plasmagruppen die Chance auf eine Isoagglutinin-titerreduktion  $\geq 2,5$  gesenkten Titerstufen größer ist. Abschließend wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test untersucht in wie weit die Anzahl der durchgeführten IA vom Isoagglutinin-titer vor erster IA abhängt. Zur besseren Übersicht wurden die Isoagglutinin-titer in allen Tabellen wie folgt dargestellt: Isoagglutinin-titer 0 entspricht einem Titer unter der Nachweisgrenze bei negativer Agglutinationsreaktion, der Isoagglutinin-titer 1:1 entspricht 1, der Isoagglutinin-titer 1:2 entspricht 2, der Isoagglutinin-titer 1:4 entspricht 4, der Isoagglutinin-titer 1:8 entspricht 8 usw. In allen durchgeführten statistischen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant festgelegt.

#### **4.4.2 Begründung für die Wahl der Tests**

##### **4.4.2.1 Rangkorrelation nach Spearman**

Aufgrund ordinal skalierten Merkmale wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Er ist robust gegenüber Ausreißern und benötigt nicht die Annahme einer linearen Beziehung zwischen den Merkmalen. Die Nullhypothese ( $H_0$ ) dieser Korrelationsanalyse geht davon aus, dass es statistisch keinen Zusammenhang zwischen den untersuchten Merkmalen gibt. Das Signifikanzniveau wurde mit  $\alpha = 0,05$  festgelegt. War  $p \geq \alpha$ , wurde  $H_0$  bestätigt, war  $p < \alpha$ , galt das Vorliegen einer Korrelation statistisch als gesichert (Lorenz 2008). Der zugehörige Korrelationskoeffizient ( $r_s$ ) gibt die Stärke und die Richtung des statistischen Zusammenhangs an. Er kann Werte zwischen  $-1$  und  $+1$  annehmen, wobei das Vorzeichen festlegt, ob die Korrelation positiv (+) oder negativ (–) ist. Im Falle von  $r_s = 0$  liegt statistisch kein Zusammenhang vor. Folgende Grenzen sind für die Bewertung des Korrelationskoeffizienten festgelegt worden: Zwischen  $-0,3 < r_s < +0,3$  wurde ein schwacher, zwischen  $+/- 0,3 < r_s < +/- 0,7$  ein mittlerer und zwischen  $+/- 0,7 < r_s < +/- 1$  ein starker statistischer Zusammenhang angenommen. Zu beachten ist, dass auf Grund von Korrelationen jedoch keine Aussagen über kausale Zusammenhänge gemacht werden können.

##### **4.4.2.2 Kruskal-Wallis-Test**

Zum globalen Vergleich mehrerer, voneinander unabhängiger Plasmavoluminagruppen kam der Kruskal-Wallis-Test zur Anwendung. Seine Nullhypothese ( $H_0$ ) besagt, dass statistisch kein Unterschied zwischen mindestens zwei der drei untersuchten Gruppen besteht. Die Alternativhypothese ( $H_A$ ) besagt, dass es einen Unterschied zwischen den Gruppen gibt. Das Signifikanzniveau war mit  $\alpha = 0,05$  festgelegt. War  $p \geq \alpha$ , so wurde  $H_0$  bestätigt, war  $p < \alpha$ , wurde  $H_0$  abgelehnt, womit statistisch ein signifikanter Unterschied zwischen mindestens zwei der Gruppen gesichert werden konnte. Das in den IA behandelte Hämatokrit-korrigiertes Plasmavolumen war für die Analyse in folgende drei Gruppen gestaffelt:

- Plasmagruppe 0 = 0 bis 1,49 L Hämatokrit-korrigiertes Plasmavolumen
- Plasmagruppe 1 = 1,5 bis 1,99 L Hämatokrit-korrigiertes Plasmavolumen
- Plasmagruppe 2 =  $\geq 2$  L Hämatokrit-korrigiertes Plasmavolumen

#### 4.4.2.3 Mann-Whitney-U-Test und $\alpha$ -Adjustierung

Im Falle der Ablehnung von  $H_0$  mit  $p < \alpha$  im Kruskal-Wallis-Test, waren weitere statistische Tests erforderlich, um eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Plasmavoluminagruppen vornehmen zu können. Als weiterführender statistischer Test wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet, mit welchem das Vorliegen eines signifikanten Unterschiedes zwischen je zwei verschiedenen und voneinander unabhängigen Plasmavoluminagruppen geprüft werden konnte. Die Nullhypothese ( $H_0$ ) besagt, dass sich die verglichenen Gruppen nicht voneinander unterscheiden. Das Signifikanzniveau war mit  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Anschließend wurden die ermittelten p-Werte einer  $\alpha$ -Adjustierung unterzogen. Hierfür wurden sie der Größe nach geordnet und nach den in Tabelle 5 dargestellten Signifikanzschranken des nach Shaffer modifizierten Holm-Verfahrens (Horn und Vollandt 1995) bewertet. Mit dem kleinsten p-Wert beginnend wurden sie nacheinander mit den rangzugehörigen Signifikanzschranken verglichen. War der p-Wert kleiner als seine Schranke, wurde  $H_0$  abgelehnt und die Unterschiede der verglichenen Gruppen als signifikant betrachtet. Das Testverfahren wurde abgebrochen, sobald ein untersuchter p-Wert größer als seine Signifikanzschranke war. Dieser sowie alle restlichen, ranghöheren p-Werte wurden nicht weiter untersucht und  $H_0$  als bestätigt betrachtet (Lorenz 2008).

Der Mann-Whitney-U-Test wurde außerdem gewählt um bei nicht-normalverteilten Daten zu prüfen ob Patienten mit hohen Isoagglutinintitern vor erster IA signifikant mehr IA benötigen als Patienten mit normalen Isoagglutinintitern. Der Isoagglutinintiter vor erster IA wird als „Ausgangstiter“ bezeichnet. Unter einem hohen Ausgangstiter versteht man hierbei Anti-A1-, Anti-A2- oder Anti-B-Isoagglutinintiter von  $> 1:128$  vor erster IA (Wilpert et al. 2007). Die Titergruppen waren für den Test wie folgt codiert:

- Gruppe 1 = Patienten mit normalen Ausgangstitern  
(Anti-A1-, Anti-A2-, Anti-B-Isoagglutinintiter  $\leq 1:128$  vor 1.IA)
- Gruppe 2 = Patienten mit hohen Ausgangstitern  
(Anti-A1-, Anti-A2-, Anti-B- Isoagglutinintiter  $> 1:128$  vor 1.IA)



**Tabelle 5: Signifikanzschranken für das nach Schaffer modifizierte Holm-Verfahren für den Vergleich von drei unabhängigen Gruppen mit gesicherter Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test**

Reihenfolge der p-Werte	1.	2.	3.
Signifikanzschranken für die p-Werte	$\alpha$ (= 0,05)	$\alpha$ (= 0,05)	$\alpha$ (= 0,05)

**Tabelle 6: Signifikanzschranken für das nach Schaffer modifizierte Holm-Verfahren für den Vergleich von drei unabhängigen Gruppen ohne gesicherte Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test**

Reihenfolge der p-Werte	1.	2.	3.
Signifikanzschranken für die p-Werte	$\alpha/3$ (= 0,016)	$\alpha$ (= 0,05)	$\alpha$ (= 0,05)

#### 4.4.2.4 Berechnung der Odds-Ratio

Das Quotenverhältnis, auch Odds-Ratio genannt, ist ein Assoziationsmaß, das den Grad eines Zusammenhanges zwischen zwei Alternativmerkmalen quantifiziert (Weiß 2010). Ein Odds ist hierbei das Verhältnis aus zwei zusammen gehörenden Häufigkeiten. Das Quotenverhältnis nimmt Werte zwischen 0 und  $\infty$  an. Ein Quotenverhältnis von 1 bedeutet, dass kein Unterschied zwischen den Odds in den verglichenen Gruppen besteht. Ein Wert  $> 1$  bedeutet, dass die Odds der ersten Gruppe größer sind, ein Wert  $< 1$  dass die Odds der ersten Gruppe kleiner sind. Das Signifikanzniveau wurde mit  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Die Codierung der Merkmale für diesen statistischen Test erfolgte nach folgendem Schema:

Titergruppe 1 = TD  $\geq$  2,5 gesenkte Isoagglutinintiterstufen

Titergruppe 2 = TD  $<$  2,5 gesenkte Isoagglutinintiterstufen

Plasmagruppe 1 = 0,00 bis 1,99 L Hämatokrit-korrigiertes Plasmavolumen

Plasmagruppe 2 =  $\geq$  2,00 L Hämatokrit-korrigiertes Plasmavolumen

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Charakterisierung des Patienten- und Kontrollkollektivs

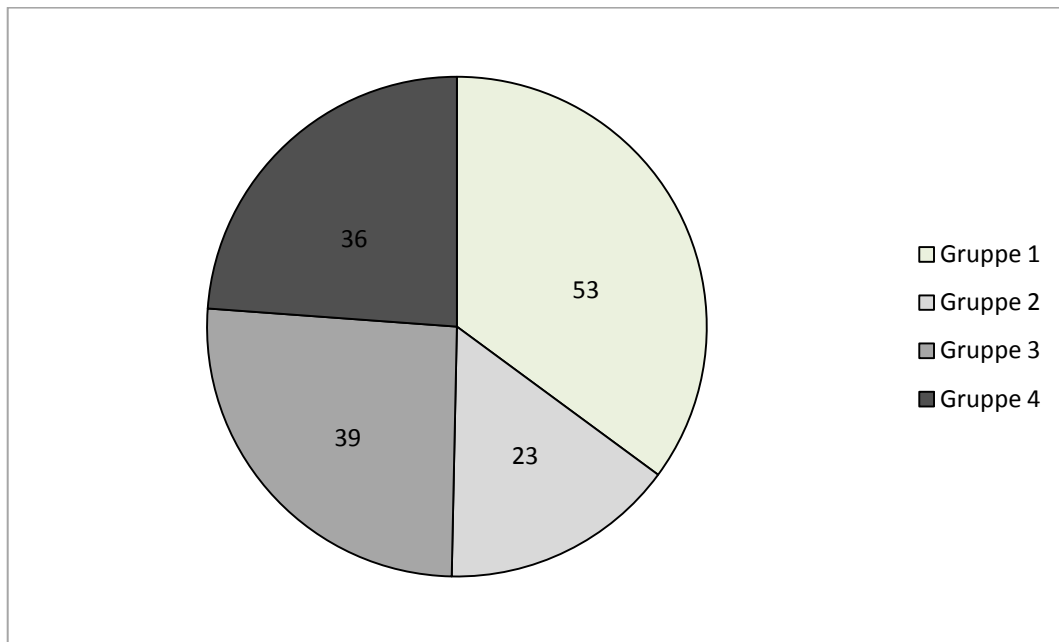
#### 5.1.1 Patientenparameter

Die Messung der Isoagglutinititer erfolgte bei 25 Patienten, die nach vorliegender Grunderkrankung in vier Patientengruppen eingeteilt waren (vergleiche Tabelle 2 und 3). Insgesamt wurden bei diesen Patienten 151 IA durchgeführt (Abbildung 17). Bei einer Spanne von 2 bis 19 IA erhielt jeder Patient durchschnittlich  $6,0 \pm 3,8$  IA. Anhand der Tabellen 2 und 3 wird deutlich, dass die Geschlechterverteilung innerhalb des Patientenkollektivs sowie zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv annähernd homogen war. Hingegen war die Geschlechterverteilung im Kontrollkollektiv unausgeglichen: Gruppe 2 bestand nur aus männlichen und Gruppe 3 nur aus weiblichen Patienten. Bei der Altersverteilung war das Patientenkollektiv im Schnitt ca. zehn Jahre älter als das Kontrollkollektiv und auch innerhalb des Kontrollkollektivs unterschied sich das Durchschnittsalter der Gruppen 2 bis 4 um bis zu zehn Jahre voneinander. Die jüngsten Patienten fanden sich in Gruppe 2, gefolgt von Gruppe 3, 4 und 1. Ebenso unterschieden sich die Behandlungszeiträume der Patienten: Der des Patientenkollektivs lag mit einem durchschnittlichen Behandlungszeitraum von  $20,4 \pm 29,2$  Tagen (Spanne 5 bis 86 Tage) in etwa doppelt so hoch wie der des Kontrollkollektivs mit durchschnittlich  $12,5 \pm 10,0$  Tagen (Spanne 3 bis 38 Tage). Zuletzt war auch die Blutgruppenverteilung zwischen und innerhalb des Patienten- und Kontrollkollektivs inhomogen (Tabelle 7), sodass in allen Patientengruppen unterschiedliche Isoagglutinine gemessen wurden.

**Tabelle 7: Blutgruppenverteilung des Patienten- und Kontrollkollektivs**

AB0-Blutgruppe	Patientenkollektiv	Kontrollkollektiv		
		Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
A	2	4	-	1
B	1	1	1	-
0	4	1	5	5
AB	-	-	-	-

---



**Abbildung 17: Anteil der Patientengruppen an allen Immunadsorptionen**

Gruppe 1 = Patienten mit geplanter AB0-inkompatibler Tx, Gruppe 2 = Patienten mit Rejektion nach AB0-kompatibler Tx, Gruppe 3 = Patienten mit irregulären Antikörpern, Gruppe 4 = Patienten mit hämatologischer/autoimmuner Grunderkrankung

### 5.1.2 Behandlungsparameter

Da für jede IA eines Patienten die Dauer, der Blutfluss im Apheresesegerät, das in der IA behandelte Plasmavolumen und das daraus rechnerisch ermittelte Hämatokrit-korrigierte Plasmavolumen ( $PV_{Hct}$ ) sowie das Verhältnis des Antikoagulans ACD-A zu Vollblut dokumentiert wurden, konnte eine Charakterisierung dieser Parameter durch Lage- und Streuungsmaße erstellt werden (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Behandlungsparameter aller 151 durchgeführten Immunadsorptionen**

*Abkürzungen:*  $PV_{Hct}$  = Hämatokrit-korrigiertes Plasmavolumen, AK:VB = Verhältnis Antikoagulans zu Vollblut

Parameter	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median
Dauer (min)	79	404	$293,2 \pm 57,1$	291
Blutfluss (ml/min)	28	55	$43,6 \pm 5,5$	45
Plasmavolumen (L)	0,9	9,4	$6,2 \pm 1,5$	6,2
$PV_{Hct}$ (L)	0,3	3,1	$1,8 \pm 0,4$	1,8
AK: VB	1:10,0	1:50,0	$1:15,5 \pm 4,9$	1:15,1

## 5.2 Isoagglutinintiter der Patienten

Die Isoagglutinintiter der 25 Patienten wurden in allen Fällen sowohl im Röhrchentest (RT) als auch im Gelkartentest (GKT) bestimmt. Die Darstellung der Titer erfolgt wie unter Punkt 4.4.1 beschrieben. Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die maximalen Isoagglutinintiter, die prä- und posttherapeutisch gemessen wurden. Tabelle 10 zeigt die gruppenspezifischen maximalen prätherapeutischen Isoagglutinintiter.

Bei Betrachtung der Mediane konnte der niedrigste Isoagglutinintiter vor einer IA in Gruppe 2 (RT und GKT), der höchste in Gruppe 1 und 4 (RT) bzw. 3 und 4 (GKT) gemessen werden.

**Tabelle 9: Maximal gemessene Isoagglutinintiter vor und nach Immunadsorption aller 25 Patienten**

Testart	Maximum	Anti-A1	Anti-A2	Anti-B
RT	vor IA	256	256	256
	nach IA	128	64	128
GKT	vor IA	2048	1024	512
	nach IA	1024	512	256

**Tabelle 10: Gruppenspezifische maximale Isoagglutinintiter vor einer Immunadsorption**

Testart	Gruppe	Anti-A1	Anti-A2	Anti-B	MW	MED
RT	1	256	128	256	213,3 ± 73,9	256
	2	64	16	128	69,3 ± 56,2	64
	3	128	64	128	106,7 ± 37,0	128
	4	256	256	256	256,0 ± 0,0	256
GKT	1	2048	512	512	1024,0 ± 886,8	512
	2	64	32	128	74,7 ± 48,9	64
	3	1024	1024	512	853,3 ± 295,6	1024
	4	1024	1024	256	768,0 ± 443,4	1024

### 5.3 Isoagglutinititerreduktion innerhalb der Immunadsorptionen

Um die Effektivität der Isoagglutinititerreduktion pro IA in Abhängigkeit vom verwendeten Säulensystem beurteilen zu können, wurden für jede Patientengruppe der „intra treatment titer drop“ (TD) und der „average titer drop“ (aTD) bestimmt (siehe 4.3.7.3). Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 und 12 dargestellt.

Der Isoagglutinititer konnte pro IA im Patientenkollektiv um maximal vier und im Kontrollkollektiv um maximal fünf Titerstufen gesenkt werden (Tabelle 11). Die mediane Reduktion der Isoagglutinititer war dabei in Gruppe 2 (RT und GKT) am niedrigsten und in Gruppe 1 (RT) bzw. Gruppe 1, 3 und 4 (GKT) am höchsten. Beim gruppenspezifischen Vergleich der maximal erreichten aTD-Werte konnte der niedrigste aTD von 1,0 Titerstufen (RT und GKT) wiederum in Gruppe 2, der höchste aTD von 4,0 (RT) bzw. 3,0 (GKT) Titerstufen in Gruppe 4 gemessen werden (Tabelle 12).

**Tabelle 11: Gruppenspezifische maximal gesenkte Isoagglutinititerstufen pro IA (intra treatment titer drop)**

Testart	Gruppe	Anti-A1	Anti-A2	Anti-B	MW	MED
RT	1	4,0	4,0	4,0	4,0 ± 0,0	4,0
	2	2,0	2,0	2,0	2,0 ± 0,0	2,0
	3	4,0	3,0	3,0	3,3 ± 0,6	3,0
	4	4,0	3,0	3,0	3,3 ± 0,6	3,0
GKT	1	4,0	4,0	4,0	4,0 ± 0,0	4,0
	2	2,0	3,0	1,0	2,0 ± 1,0	2,0
	3	4,0	4,0	3,0	3,7 ± 0,6	4,0
	4	5,0	4,0	4,0	4,3 ± 0,6	4,0

**Tabelle 12: Gruppenspezifischer maximaler aTD pro IA für die einzelnen Isoagglutinine**

Testart	Gruppe	Anti-A1	Anti-A2	Anti-B
RT	1	2,4	2,5	1,8
	2	1,0	1,5	1,0
	3	1,2	1,2	1,6
	4	3,0	4,0	2,5
GKT	1	2,6	4,0	1,8
	2	1,5	2,0	1,0
	3	2,2	2,0	2,0
	4	3,0	3,0	2,2

## 5.4 Titerreduktionsraten der Patienten

Für jeden Patienten wurde zudem die Titerreduktionsrate (TRR) seiner jeweiligen Isoagglutinine berechnet (siehe 4.3.7.2). Je höher diese war, desto effektiver waren die Immunadsorptionsbehandlungen hinsichtlich der Isoagglutinintiterreduktion, wobei ein Wert  $> 1,0$  als effizient angesehen wurde. Anschließend wurden für Patienten- und Kontrollkollektiv aus den TRR der zugehörigen Patienten die gruppenspezifischen mittleren und medianen TRR bestimmt, welche in Tabelle 13 aufgeführt sind.

Die medianen TRR des Patientenkollektivs lagen zwischen 0,4 und 1,0 (RT) bzw. 0,2 und 1,3 (GKT). Im Vergleich dazu lagen die medianen TRR des Kontrollkollektivs mit Werten zwischen 0,2 und 0,7 (RT) bzw. 0,3 und 0,8 (GKT) niedriger als die des Patientenkollektivs.

Unter Berücksichtigung der Medianwerte wurde beim Vergleich der einzelnen Patientengruppen die niedrigste TRR von 0,2 in Gruppe 3 (RT) bzw. 1 (GKT) erzielt. Die größte mediane TRR von 1,0 (RT) bzw. 1,3 (GKT) konnte in Gruppe 1 erzielt werden. Die entsprechenden Werte wurden bei unterschiedlichen Isoagglutininen gemessen.

**Tabelle 13: Gruppenspezifische durchschnittliche Titerreduktionsraten für die verschiedenen Isoagglutinine**

Testart	Gruppe	Anti-A1		Anti-A2		Anti-B	
		MW	MED	MW	MED	MW	MED
RT	1	$0,8 \pm 0,1$	0,8	$0,9 \pm 0,1$	1,0	$0,4 \pm 0,1$	0,4
	2	$0,6 \pm 0,5$	0,6	$0,7 \pm 0,1$	0,7	$0,2 \pm 0,7$	0,3
	3	$0,6 \pm 0,6$	0,3	$0,4 \pm 0,6$	0,2	$0,2 \pm 0,3$	0,2
	4	$0,4 \pm 0,3$	0,3	$0,7 \pm 0,5$	0,6	$0,5 \pm 0,3$	0,4
GKT	1	$1,4 \pm 0,6$	1,3	$0,8 \pm 0,6$	0,8	$0,3 \pm 0,1$	0,2
	2	$0,8 \pm 0,4$	0,8	$0,8 \pm 0,2$	0,8	$-0,1 \pm 0,8$	0,3
	3	$0,7 \pm 0,5$	0,5	$0,4 \pm 0,3$	0,5	$0,4 \pm 0,4$	0,3
	4	$0,7 \pm 0,5$	0,5	$0,8 \pm 0,7$	0,5	$0,9 \pm 0,6$	0,7

## 5.5 Wiederanstieg der Isoagglutinintiter zwischen zwei Immunadsorptionen

Um den Wiederanstieg der Isoagglutinintiter zwischen zwei aufeinander folgenden IA zu beurteilen, wurden für jede Patientengruppe das TI und das aTI berechnet (siehe 4.3.7.3). Die Ergebnisse sind in den Tabellen 14 und 15 dargestellt, wobei ein aTI von  $> 2,0$  Titerstufen als hoher „Titerrebound“ angesehen wird.

Im Patientenkollektiv zeigte sich ein maximaler Wiederanstieg der Isoagglutinintiter (TI) um bis zu vier und im Kontrollkollektiv um bis zu sechs Titerstufen (Tabelle 14). Bei Betrachtung der Medianwerte war das TI mit zwei Titerstufen (RT und GKT) erneut in Gruppe 2 am niedrigsten und mit vier (RT) bzw. fünf (GKT) Titerstufen in den Gruppen 3 und 4 am höchsten. Das niedrigste aTI konnte mit 0,5 (RT) bzw. 1,0 (GKT) Titerstufe in Gruppe 2, das größte aTI mit 3,0 (RT) bzw. 4,0 (GKT) Titerstufen in Gruppe 4 gemessen werden (Tabelle 15).

**Tabelle 14: Gruppenspezifisches maximales „Titer increment“ (TI) der Isoagglutinine**

Testart	Gruppe	Anti-A1	Anti-A2	Anti-B	MW	MED
RT	1	4,0	3,0	2,0	$3,0 \pm 1,0$	3,0
	2	1,0	2,0	4,0	$2,3 \pm 1,5$	2,0
	3	4,0	4,0	3,0	$3,7 \pm 0,6$	4,0
	4	4,0	3,0	4,0	$3,7 \pm 0,6$	4,0
GKT	1	4,0	4,0	3,0	$3,7 \pm 0,6$	4,0
	2	1,0	1,0	4,0	$2,0 \pm 1,7$	1,0
	3	4,0	4,0	4,0	$4,0 \pm 0,0$	4,0
	4	6,0	5,0	4,0	$5,0 \pm 1,0$	5,0

**Tabelle 15: Gruppenspezifisches maximales „Average titer increment“ (aTI) der Isoagglutinine**

Testart	Gruppe	Anti-A1	Anti-A2	Anti-B
RT	1	2,5	2	1
	2	0,5	2,0	1,0
	3	2,0	2,0	1,8
	4	3,0	3,0	3,0
GKT	1	2,0	2,5	2,0
	2	1,0	1,0	1,6
	3	2,5	2,3	2,0
	4	3,0	4,0	2,3

## 5.6 Korrelation der Isoagglutinintiterreduktion innerhalb einer Immunadsorption mit dem Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumen

Mittels Rangkorrelation nach Spearman sollte der Zusammenhang zwischen der Isoagglutinintiterreduktion innerhalb einer IA und der Menge des behandelten Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens ( $PV_{Hct}$ ) untersucht werden. Hierfür wurde der Rangkorrelationskoeffizient  $r_s$  nach Spearman berechnet.

Dabei betrug das im Patientenkollektiv behandelte  $PV_{Hct}$   $1,6 \pm 0,3$  (Mittelwert) bzw. 1,6 (Median) L und das im Kontrollkollektiv behandelte  $PV_{Hct}$   $1,9 \pm 0,4$  (Mittelwert) bzw. 1,9 (Median) L.

### 5.6.1 Absolute Isoagglutinintiterreduktion in Abhängigkeit vom Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumen

Zunächst wurde die Korrelationsanalyse für jedes einzelne Isoagglutinin durchgeführt. Signifikante Korrelationen mit  $p < 0,05$  ließen sich nur für einzelne IA der Patientengruppen 2 und 3 berechnen (Tabelle 16), wobei sich stark positive bzw. negative statistische Zusammenhänge zeigten. Für alle übrigen IA ließ sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachweisen (Daten nicht gezeigt).



**Tabelle 16: Überblick der statistisch signifikanten Korrelationen zwischen absoluter Isoagglutinititerreduktion innerhalb einer IA und Hämatokrit-korrigiertem Plasmavolumen**

*Abkürzungen:* Spearman-Rho  $r_s$  = Korrelationskoeffizient, p-Wert = Signifikanzwert

Testart	Gruppe	Nr. der IA	Spearman- Rho $r_s$			p-Wert
			Anti-A1	Anti-A2	Anti-B	
RT	2	1	-1,0	-1,0	-	< 0,01
		2	-	+1,0	-	< 0,01
		3	-1,0	+1,0	-	< 0,01
	3	1	-	-	-0,9	0,041
GKT	2	1	+1,0	+1,0	-	< 0,01
		2	-1,0	-1,0	-	< 0,01
	3	1	-0,8	-1,0	-	0,046

In Gruppe 3 war der Zusammenhang in der ersten IA mit  $r_s$  zwischen -0,82 und -0,97 in beiden Testmethoden stark negativ, sodass hier die Isoagglutinititerreduktion umso geringer war, je mehr Hämatokrit-korrigiertes Plasmavolumen behandelt wurde. In Gruppe 2 lies sich für die signifikanten Ergebnisse hingegen kein einheitlicher Zusammenhang erkennen, da sich die Richtung und Stärke der Korrelationen der ersten drei IA mit  $r_s$  zwischen -1,0 und +1,0 isoagglutininspezifisch deutlich unterschied oder sogar gegensätzlich war.

### 5.6.2 Durchschnittliche Isoagglutinititerreduktion in Abhängigkeit vom Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumen

Auch für den Zusammenhang zwischen durchschnittlicher Isoagglutinititerreduktion innerhalb einer IA und der Menge des behandelten Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens zeigten sich statistisch hoch signifikante Korrelationen (Tabelle 17). Lediglich für Gruppe 2 ließen sich im GKT keine statistisch signifikanten Korrelationen berechnen.

**Tabelle 17: Überblick der statistisch signifikanten Korrelationen zwischen durchschnittlicher Isoagglutinititerreduktion innerhalb einer IA und dem Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumen**

*Abkürzungen:* Spearman-Rho  $r_s$  = Korrelationskoeffizient, p-Wert = Signifikanzwert

Testart	Gruppe	Nr. der IA	Spearman-Rho $r_s$	p-Wert
RT	1	9	-1,0	<0,01
	2	4	+1,0	<0,01
	3	7	+1,0	<0,01
		8	+1,0	<0,01
		9	+1,0	<0,01
	4	7	-1,0	<0,01
		8	+1,0	<0,01
		9	+1,0	<0,01
GKT	1	8	+1,0	<0,01
	3	1	-0,9	<0,01
		6	-1,0	<0,01
		7	-1,0	<0,01
		8	-1,0	<0,01
		9	-1,0	<0,01
	4	6	-1,0	<0,01
		7	-1,0	<0,01
		8	-1,0	<0,01
		9	+1,0	<0,01

Im Patientenkollektiv zeigte sich im RT in der 9. IA mit  $r_s = -1,0$  ein stark negativer Zusammenhang, sodass die durchschnittliche Isoagglutinititerreduktion umso geringer war, je mehr Hämatokrit-korrigiertes Plasmavolumen behandelt wurde. Im GKT war der Zusammenhang in der 8. IA mit  $r_s = +1,0$  genau umgekehrt, die durchschnittliche Isoagglutinititerreduktion war umso höher, je größer das Plasmavolumen war. Im Kontrollkollektiv zeigten sich im RT überwiegend stark positive (85,7 %), im GKT überwiegend stark negative (88,8 %) Zusammenhänge. Im RT korreliert also ein höheres Plasmavolumen mit einer höheren durchschnittlichen Isoagglutinititerreduktion, im GKT ist der Zusammenhang umgekehrt.

## 5.7 Einfluss der Höhe des Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens auf die durchschnittliche Isoagglutinintiterreduktion innerhalb einer IA

Um eine Empfehlung hinsichtlich des in einer IA zu behandelnden Plasmavolumens geben zu können, wurde mit Hilfe des globalen, nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests untersucht, ob ein statistisch signifikanter Einfluss einer bestimmten Menge Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens auf die durchschnittliche Isoagglutinintiterreduktion besteht. Das Hämatokrit-korrigierte Plasmavolumen war hierfür in drei Gruppen gestaffelt (siehe 4.4.2.2). In die Analyse wurden alle 151 durchgeführten IA eingeschlossen.

Nur in einem Fall (6. IA GKT) unterschieden sich zwei der drei Plasmavoluminagruppen im Kruskal-Wallis-Test signifikant voneinander, da  $p = 0,021$  war (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Signifikante Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Test für den Einfluss des Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens auf die durchschnittliche Isoagglutinintiterreduktion**

*Abkürzungen:* Nr. = Nummer,  $PV_{Hct}$  = Hämatokrit-korrigiertes Plasmavolumen (L), p-Wert = Signifikanzwert

Nr. der IA	mittlere Ränge			p-Wert
	Plasmagruppe 0 (0 bis 1,49 L $PV_{Hct}$ )	Plasmagruppe 1 (1,5 bis 1,99 L $PV_{Hct}$ )	Plasmagruppe 2 ( $\geq 2,00$ L $PV_{Hct}$ )	
6. IA GKT	8,25	7,25	2,0	0,021

---

Um nun herauszufinden welche der drei Plasmagruppen sich unterschieden, wurden die drei Plasmagruppen anschließend mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests paarweise miteinander verglichen, wobei sich die in Tabelle 19 aufgeführten p-Werte ergaben. Diese wurden der Größe nach aufsteigend geordnet und mit den Signifikanzschranken des Holm-Schaffer-Verfahrens verglichen (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 19: Ergebnisse des paarweisen Vergleichs der drei Plasmagruppen untereinander zur Untersuchung der Abhängigkeit der durchschnittlichen Isoagglutinititerreduktion vom Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumen (6. IA GKT)**

*Abkürzungen:*  $PV_{Hct}$  = Hämatokrit-korrigiertes Plasmavolumen (L), p-Werte= Signifikanzwerte

verglichene Plasmagruppen	p-Werte
0 und 1	$p_{0,1} = 0,786$
0 und 2	$p_{0,2} = 0,100$
1 und 2	$p_{1,2} = 0,024$

Bei Gegenüberstellung der einzelnen Plasmagruppen konnte festgestellt werden, dass ein statistisch signifikanter Unterschied nur in der 6. IA (GKT) zwischen Plasmagruppe 1 und 2 mit  $p = 0,024$  bestand (Tabelle 19). Beim Vergleich der mittleren Ränge dieser zwei Plasmagruppen (vergleiche Tabelle 18) lag der höhere bei Plasmagruppe 1 (7,25 für Plasmagruppe 1 vs. 2,00 für Plasmagruppe 2). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass in dieser IA ein  $PV_{Hct}$  zwischen 1,50 und 1,99 L zu einer größeren durchschnittlichen Isoagglutinititerreduktion führt als ein  $PV_{Hct}$  von  $\geq 2,00$  L. Für alle anderen IA konnte anhand des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests kein signifikanter Unterschied zwischen den Plasmagruppen ermittelt werden, da  $p \geq 0,05$  war. Somit zeigt sich dort kein statistisch signifikantes Ergebnis, das darauf hindeutet, dass eine Unterscheidung der Plasmagruppen hinsichtlich deren Einfluss auf die durchschnittliche Isoagglutinititerreduktion zulässig ist.

## 5.8 Wahrscheinlichkeit einer hohen durchschnittlichen Isoagglutinititerreduktion in Abhängigkeit vom Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens

Aus klinischen und ökonomischen Gesichtspunkten sollte die Anzahl der IA pro Patient möglichst gering gehalten werden. Primäres Ziel ist daher eine Reduktion des Isoagglutinititers um mehr als zwei Titerstufen pro IA. Durch den Vergleich zweier Plasmagruppen mittels Berechnung der Odds-Ratio (OR) konnte ermittelt werden in welcher die Chance einer durchschnittlichen Isoagglutinititerreduktion von  $\geq 2,5$  gesenkten Titerstufen höher ist (siehe 4.4.2.4). Die Ergebnisse der berechneten OR sind in Tabelle 20 widergegeben. Es wurden erneut alle IA der 25 Patienten analysiert.

**Tabelle 20: Ergebnisse der Berechnung der Chance (Odds-Ratio) für eine durchschnittlichen Isoagglutininintiterreduktion  $\geq 2,5$  Titerstufen in Abhängigkeit des Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens mit zugehörigen Konfidenzintervallen**

*Abkürzungen:* IA = Nummer der Immunadsorption, N = Anzahl eingeschlossener Patienten, OR = Odds- Ratio

Testart	Nr. der IA	N	Odds-Ratio	95%-Konfidenzintervall	
				untere Grenze	obere Grenze
RT	1	25	0,50	0,04	6,55
	1	25	0,17	0,02	1,68
	2	25	0,24	0,03	2,22
	3	24	1,85	0,17	20,26

Da die OR im RT bei 0,50 lag, war in dieser IA die Chance einer durchschnittlichen Isoagglutininintiterreduktion von  $\geq 2,5$  gesenkten Titerstufen bei Patienten, die ein 0,00 bis 1,99 L hohes  $PV_{Hct}$  aufwiesen, kleiner als bei denen mit  $\geq 2,00$  L behandeltem  $PV_{Hct}$ . Dasselbe galt für die erste und zweite IA im GKT, da hier die OR bei 0,17 und 0,24 lagen. Nur im Fall der 3. IA GKT war die Chance einer durchschnittlichen Isoagglutininintiterreduktion von  $\geq 2,5$  gesenkten Titerstufen in der Plasmagruppe mit dem niedrigeren  $PV_{Hct}$  größer als in der Gruppe mit dem höheren, da die OR hier 1,85 betrug. Diese Ergebnisse waren jedoch auf dem festgelegten Signifikanzniveau von 0,05 nicht signifikant und können somit lediglich als Tendenzen gewertet werden.

## 5.9 Anzahl der Immunadsorptionen bei Patienten mit hohen bzw. normalen Isoagglutinititern vor erster Immunadsorption

Des Weiteren sollte mit dieser Arbeit die Fragestellung untersucht werden, in wie fern die Höhe des Isoagglutinititers vor der ersten Immunadsorption („Ausgangstiter“) die Anzahl der notwendigen IA beeinflusst. Ein Isoagglutinititer von  $> 1:128$  vor erster IA wurde als hoher Ausgangstiter angesehen.

### 5.9.1 Anzahl durchgeführter Immunadsorptionen in Abhängigkeit von der Höhe der Isoagglutinititer vor der ersten Immunadsorption

Neun der 25 untersuchten Patienten (36,0 %) wiesen einen hohen Ausgangstiter (Isoagglutinititer  $> 1:128$  vor erster IA) auf (Tabelle 22). Diese Patienten erhielten durchschnittlich  $6,6 \text{ IA} \pm 3,0 \text{ IA}$ . Die übrigen 16 Patienten (64,0 %) mit normalen Ausgangstitern (Isoagglutinititer  $\leq 1:128$  vor der ersten IA) unterzogen sich im Mittel  $5,8 \text{ IA} \pm 4,3 \text{ IA}$  unterzogen.

**Tabelle 21: Gruppenspezifischer Anteil der Patienten mit hohen Ausgangstitern an allen 25 Patienten**

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Anzahl	4	0	3	2
%	16	0	12	8

---

In fünf der neun Fälle wurde der hohe Ausgangstiter nur im GKT gemessen. Zwei Patienten gehörten zu Gruppe 1 und drei Patienten zur Gruppe 3. In den anderen vier Fällen wurden die hohen Ausgangstitern sowohl im RT als auch im GKT kombiniert gemessen. Eine Hälfte der Patienten gehörte Gruppe 1, die andere Hälfte der Gruppe 4 an.

Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurde untersucht ob Patienten mit hohen Ausgangstitern signifikant mehr IA benötigen als Patienten mit normalen Ausgangstitern. Um eine ausreichend große Stichprobengröße zu erhalten, wurde diese Untersuchung unabhängig von der Art der verwendeten Immunadsorptionssäule mit allen 25 Patienten durchgeführt.

**Tabelle 22: Überblick über die Ergebnisse des paarweisen Vergleichs der Ausgangstitergruppen mittels Mann-Whitney-U-Tests zum statistischen Nachweis eines signifikanten Unterschiedes hinsichtlich der Anzahl durchgeführter Immunadsorptionen**

*Abkürzungen:* Gruppe 1 = Patienten mit normalen Ausgangstitern, Gruppe 2 = Patienten mit hohen Ausgangstitern, N = Anzahl eingeschlossener Patienten, Q.25 = 0,25-Quantil, Q.75 = 0,75-Quantil, p-Wert = Signifikanzwert

Gruppe	N	Median	Q.25	Q.75	mittlerer Rang	p-Wert
1	16	4	3	7,5	11,84	$p_{1,2} = 0,301$
2	9	6	3,5	9,5	15,06	

Da der höhere mittlere Rang bei Gruppe 2 lag (11,84 in Gruppe 1 vs. 15,06 in Gruppe 2) lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass Patienten mit hohen Ausgangstitern mehr IA benötigen als Patienten mit normalen Ausgangstitern (Tabelle 23). Dieses Ergebnis war jedoch auf dem festgelegten Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  statistisch nicht signifikant, da  $p = 0,301$  war.

### **5.9.2 Vergleich von Patienten- und Kontrollkollektiv hinsichtlich der Anzahl durchgeführter Immunadsorptionen in Abhängigkeit von der Höhe des Ausgangstiters**

Vier der sieben Patienten (57,1 %) des Patientenkollektivs (Gruppe 1) wiesen hohe Ausgangstiter auf, die Hälfte davon im GKT, die andere Hälfte kombiniert im RT und GKT. Diese Patienten erhielten durchschnittlich  $5,3 \pm 2,6$  IA vor der geplanten AB0-inkompatiblen Tx, wobei nur einer der vier Patienten transplantiert wurde. Die anderen drei Patienten mit normalen Ausgangstitern erhielten hingegen nur  $3,7 \pm 0,6$  IA (Mittelwert) vor der AB0- inkompatiblen Tx und konnten alle transplantiert werden.

Innerhalb des Kontrollkollektivs (Gruppe 2 - 4) konnten bei fünf der 16 Patienten (31,2 %) hohe Ausgangstiter gemessen werden: In Gruppe 3 (N = 6) bei drei Patienten (50,0 %), die alle isoliert im GKT gemessen wurden und in Gruppe 4 (N = 6) bei zwei Patienten (33,3 %), die im RT und GKT kombiniert gemessen wurden. Hingegen wurden in Gruppe 2 weder im RT noch im GKT hohe Ausgangstiter gemessen. Die Tabellen 24 und 25 geben einen Überblick über die gruppenspezifischen durchschnittlichen Ausgangstiter und die zugehörige Anzahl an IA.

**Tabelle 23: Gruppenspezifische durchschnittliche Ausgangstiter mit zugehöriger durchschnittlicher Anzahl an Immunadsorptionen für die Patienten mit hohen Ausgangstitern**

*Abkürzungen:* MW = Mittelwert, MED = Median

Testart	Gruppe	Mittelwerte der Isoagglutininintiter			Anzahl der IA	
		Anti-A1	Anti-A2	Anti-B	MW	MED
RT	1	256,0	-	256,0	6,0 ± 2,9	6,0
	3	-	-	256,0	7,3 ± 3,2	6,0
	4	256,0	256,0	-	6,5 ± 4,9	6,0
GKT	1	1536,0	512,0	1280,0	6,0 ± 2,9	6,0
	3	683,0	640,0	-	7,3 ± 3,2	6,0
	4	1024,0	640,0	-	6,5 ± 4,9	6,0

**Tabelle 24: Gruppenspezifische durchschnittliche Ausgangstiter mit zugehöriger durchschnittlicher Anzahl an Immunadsorptionen für die Patienten mit normalen Ausgangstitern**

*Abkürzungen:* MW = Mittelwert, MED = Median

Testart	Gruppe	Mittelwerte der Isoagglutininintiter			Anzahl der IA	
		Anti-A1	Anti-A2	Anti-B	MW	MED
RT	1	18,0	17,0	2,0	9,7 ± 8,1	6,0
	2	24,0	10,0	21,0	3,8 ± 2,1	3,0
	3	56,0	15,0	24,0	5,7 ± 3,8	4,0
	4	13,0	17,0	41,0	5,8 ± 2,5	5,0
GKT	1	32,0	10,0	2,0	9,7 ± 8,1	6,0
	2	48,0	17,0	31,0	3,8 ± 2,1	3,0
	3	87,0	28,0	128,0	5,7 ± 3,8	4,0
	4	107,0	53,0	112,0	5,8 ± 2,5	5,0

Der höchste durchschnittliche Ausgangstiter (1:1536 im GKT) aller 25 Patienten fand sich in Gruppe 1 (Tabelle 24). Bei den Patienten mit hohen Ausgangstiter mussten die wenigsten IA (Mittelwert 3,8 ± 2,1 IA) in Gruppe 1 und die meisten (Mittelwert 7,3 ± 3,2 IA) in Gruppe 3 durchgeführt werden. Bei den Patienten mit normalen Ausgangstitern fanden sich die wenigsten IA (Mittelwert 3,8 ± 2,1 IA) in Gruppe 2, die meisten (Mittelwert 9,7 ± 8,1) in Gruppe 1.



## **6 Diskussion**

### **6.1 Höhe der Isoagglutinintiter des Patienten- und Kontrollkollektivs**

Die perioperative Reduktion der Isoagglutinintiter stellt ein zentrales Element der Konditionierungstherapie vor AB0-inkompatibler Organtransplantation dar, da durch präformierte Isoagglutinine des Empfängers immunologische Abstoßungsreaktionen hervorgerufen werden können. Ziel der präoperativen Isoagglutinintiterreduktion ist die Vermeidung hyperakuter Transplantatrejektionen. Postoperativ sollen niedrige Titer in der Lage sein eine Akkommodation des Transplantats zu bewirken (Rydberg 2001). Akkommodation bezeichnet hierbei das Phänomen, dass eine Antigen-Antikörper-Reaktion trotz der Antigenexpression durch das Transplantat und korrespondierender Antikörper im Blut des Empfängers ausbleibt und keine Transplantatrejektion stattfindet (Takahashi 2005).

Isoagglutinine können normalerweise erstmals im Alter von sechs Monaten detektiert werden und erreichen ihren höchsten Titer im ca. fünften bis zehnten Lebensjahr (Ishida et al. 2003). Ishida et al. zeigten, dass die Titterspannweite im Erwachsenenalter sehr breit ist, meist zwischen 1:2 und 1:200 liegt und geschlechtsabhängig bei Frauen höher als bei Männern zu sein scheint. Es wurde vermutet, dass die Höhe der Isoagglutinintiter teils auf Vererbung beruht sowie teils von der Gesamtmenge an Immunglobulinen im Serum abhängt. Entgegen früherer Annahme fallen die Titer mit steigendem Alter auch nicht wieder ab (Petzl und Tanew 1985). So können auch mediane Isoagglutinintiter von 1:128 bei über 90ig-Jährigen als normal erachtet werden (Auf der Maur et al. 1993). Obwohl dabei Isoagglutinintiter von  $\geq 1:128$  von den meisten Autoren als hoch angesehen werden (Wilpert et al. 2007), existiert in der Literatur bisher kein einheitlicher Wert bezüglich des Terminus „hoher Isoagglutinintiter“. Auch die Blutgruppe des Patienten spielt für die Höhe des Isoagglutinintiters keine unbedeutende Rolle. So wiesen in einer Studie gesunde Blutspender der Blutgruppe 0 eine signifikant höhere Menge an Anti-A- und B-IgG-Isoagglutininen auf als Blutspender der Blutgruppe A und B (Lindberg et al. 2011). Bei gesunden, nichtimmunisierten Personen wird der Großteil der Isoagglutinine normalerweise von IgM gebildet, doch auch IgG und IgA können im Serum enthalten sein (Hoffbrand 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Isoagglutinititer mit Hilfe des Röhrchen- und Gelkartentests bestimmt. Die Ergebnisse des Röhrchentests wurden hierbei als IgM-Isoagglutinititer und die Ergebnisse des Gelkartentests als IgG-Isoagglutinititer interpretiert (Kumlien et al. 2006). In Kumliens Studie wird abermals die interindividuelle Variabilität sowohl der Höhe der Isoagglutinititer als auch der Verteilung der Isoagglutinklassen und -subklassen betont, sodass die prätherapeutischen maximalen Isoagglutinititer des hier untersuchten Patienten- und Kontrollkollektivs insgesamt als normal gewertet werden können. Auch lagen die gruppenspezifischen maximalen Isoagglutinititer vor IA mit 1:256 (RT) bzw. 1:2048 (GKT) nur eine Titerstufe über den in einer anderen Studie beschriebenen Isoagglutinititern vor AB0-inkompatibler Tx (Skogsberg et al. 2006). Als Grund für die hohen prätherapeutischen IgG-Isoagglutinititer der Gruppen 1, 3 und 4 können unter Berücksichtigung der Krankengeschichte der Patienten geschlechts-, schwangerschafts- sowie transfusionsbedingte Ursachen angenommen werden, da allogene Transfusionen, fetomaternale Hämorrhagien bei Schwangerschaften sowie allogene Transplantationen Isoimmunisierungen darstellen. Diese Isoimmunisierungen können zur Bildung von Immunantikörper in Form von IgG-Isoagglutininen führen (Hoffbrand 2003). Bei Immunantikörpern handelt es sich normalerweise um inkomplette Wärmeantikörper, die bei Bindung an die entsprechenden Erythrozytenantigene mehr oder minder stark Komplement binden und deshalb *in vitro* als Isohämolysine dargestellt werden können (Hassig et al. 1955). Bei gesunden Individuen gehören sie vornehmlich den Subklassen IgG1 und IgG2 an (Lindberg et al. 2011). Das Vorkommen von Isohämolysinen darf v.a. bei Frauen nicht unterschätzt werden, da sie nach Schwangerschaft in bis zu 28,1 % der mütterlichen Seren nachgewiesen werden konnten (Mollison und Cutbush 1951). Besonders im Wochenbett kann es zu beträchtlichen Titersteigerungen der Isoagglutinine inklusive der inkompletten Anti-A- und Anti-B-Immunantikörper kommen (Polayes und Mc 1948). Da alle Patientinnen der Gruppe 1 und einige Patientinnen der Gruppen 3 und 4 Kinder geboren hatten, könnte dies einen erheblichen Einfluss auf die Höhe der gemessenen IgG-Isoagglutinititer dieser Gruppe gehabt haben. Auch die Existenz der irregulären Antikörper der Patienten der Gruppe 3 kann als Hinweis auf Isoimmunisierung mit konsekutiver IgG-Titersteigerung gewertet werden. Weiterhin müssen auch die hämatologischen/autoimmunen Grunderkrankungen der Gruppe 4 als eine mögliche Ursache für die Höhe der Titer berücksichtigt werden, da bei diesen Patienten von einem veränderten bzw. gestörten Immunsystem ausgegangen werden kann. So sind beispielsweise erythrozytäre

Immunantikörper unter Patienten mit hämatologischen Erkrankungen, die häufig Transfusionen benötigen, weit verbreitet (Stiegler et al. 2001). Überraschend sind in dieser Dissertation vor allem die im Vergleich zu den anderen Gruppen niedrigen prätherapeutischen Titer der Gruppe 2, da eine Rejektion nach AB0-kompatibler Organtransplantation eigentlich auf eine Immunsierung durch das allogene Transplantat hinweist und somit höhere prätherapeutische Isoagglutinititer erwartet wurden. Als Erklärung könnte die jahrelange immunsuppressive Therapie, welche Standard nach AB0-kompatibler Tx ist, in Kombination mit der hochdosierten immunsuppressiven Rejektionstherapie dienen. Auch bestand diese Gruppe nur aus männlichen Probanden, welche laut Ishida et al. im Vergleich zu Frauen niedrigere Isoagglutinititer besitzen sollen. Allerdings muss an dieser Stelle bedacht werden, dass auch die Patienten der Gruppe 1 unter einer intensiven Immunsuppression standen und dennoch höhere prätherapeutische Isoagglutinititer aufwiesen. Somit müssen die niedrigen Titer der Gruppe 2 durch weitere Faktoren als die Immunsuppression bedingt sein.

Um den Einfluss des Geschlechts und des Alters auf die Höhe der Isoagglutinititer in weiterführenden Studien zu minimieren, sollte zukünftig auf eine homogenere Verteilung dieser Parameter unter den Patienten geachtet werden. Zudem sollte vor Beginn der Studie versucht werden den Immunisierungsgrad der teilnehmenden Probanden exakt einzuschätzen. Weiterhin könnte eine Kontrollgruppe aus gesunden Blutspendern, die nachweislich nicht immunisiert sind, gebildet werden. Um die statistische Auswertung der Isoagglutinititer zu erleichtern, sollte in Zukunft auch eine homogenere Blutgruppenverteilung zwischen sowie innerhalb von Patienten- und Kontrollkollektiv angestrebt werden. Hierbei sollten vorzugsweise Patienten der Blutgruppe 0, bei denen simultan Anti-A1-, Anti-A2- und Anti-B-Isoagglutinine gemessen werden können, rekrutiert werden. Leider war dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich.

Abschließend müssen auch die zur Isoagglutininbestimmung eingesetzten Messmethoden kritisch überdacht werden. Röhrchen- und Gelkartentest gehören zwar international zu den am häufigsten verwendeten Methoden, werden in der Literatur jedoch immer wieder kontrovers diskutiert. So soll zwar der Gelkartentest die Variabilität der Titerbestimmung im Vergleich zum Röhrchentest reduzieren können (Shirey et al. 2010), vermutlich werden dabei aber die IgG-Isoagglutinititer überschätzt. Grund dafür ist, dass bei Anwendung eines indirekten Coombstest die IgM-Isoagglutinine potenziell mit der IgG-Messung interferieren und eigentlich vor der Messung durch Dithiothreitol oder 2-Mercaptoethanol zerstört werden müssen (Valli et al. 2009). Dies war in dem von uns verwendeten

Gelkartentest jedoch nicht der Fall. Die Vorteile des Röhrchentests liegen in der Flexibilität der möglichen Umgebungsparameter (Temperatur, Zusatz von anderen Verstärkern wie z.B. Albumin), günstigen Antigen-Antikörper-Verhältnissen und den relativ geringen Kosten. Grundsätzlich scheint eine genaue Reproduzierbarkeit bei Verwendung von RT und GKT aber unwahrscheinlich, da es sich hierbei um semiquantitative und subjektive Methoden handelt (Kumlien et al. 2006). So lässt sich durch die visuelle Beurteilung der Agglutinationsreaktion eine Abhängigkeit vom Untersucher nicht von der Hand weisen. Da im klinischen Laboralltag die Beurteilung der Tests durch die immer gleiche Person jedoch aufgrund des Arbeitsschichtensystems nicht zu bewerkstelligen ist, ist diese Abhängigkeit als eindeutiger Nachteil der Methoden aufzufassen. Auch sind beide Messmethoden nicht in der Lage den Anteil der IgA-Isoagglutinine zu quantifizieren, obwohl nachweislich ein nicht unerheblicher Teil der Isoagglutinine zur IgA-Klasse gehören kann (Rieben et al. 1991). Da die IgG- und IgA-Isoagglutinititer nach Immunisierung parallel ansteigen (Rydberg et al. 1988), sollte daher bei immunisierten Patienten auch die IgA-Bestimmung erwogen werden. Allgemein scheint auch ein Vergleich der Anti-A- und -B-Isoagglutinititer zwischen den internationalen Transplantationszentren schlecht möglich, da sich die eingesetzten Detektionsmethoden häufig unterscheiden, es interinstitutionelle technische Variationen bei der Isoagglutinititation gibt und sich bis heute keine Standardmethode etabliert hat (Thaiss 2009). So konnte in einer vergleichenden Laborstudie dreißig japanischer Institute eine deutliche Variation der gemessenen Isoagglutinititer nachgewiesen werden (Tanabe 2007). Auch in einer vergleichenden Studie dreier europäischer Zentren betrug der Unterschied bei der Bestimmung der Isoagglutinititer einer Standardprobe bis zu vier Titerstufen, wenn die Institute ihre eigene Methode verwandten, hingegen nur eine Titerstufe, wenn alle drei den gleichen Gelkartentest anwendeten (Kumlien et al. 2007). Da die Anzahl prä- und postoperativer IA bis zum gewünschten Zieltiter aber vollständig von der Höhe der gemessenen Isoagglutinine abhängt, haben technische Variationen eine direkte Auswirkung auf die Anzahl und folglich auch auf die Kosten der Immunadsorptionsbehandlungen (Tyden et al. 2007). Dies sollte bei der Wahl der Messmethode intensiver beachtet werden. Daher empfehlen viele Autoren die Durchflusszytometrie (flow cytometry - FCM) als Standardmesstechnik einzuführen, da nur diese konsistente Ergebnisse bei Mehrfachmessung erbringen konnte (Krishnan et al. 2008). Vorteil ist hier der Gebrauch spezifischer sekundärer Antikörper mit deren Hilfe direkt die Menge der verschiedenen Isoagglutinklassen und -subklassen quantifiziert

werden kann, sodass die Anzahl notwendiger IA zur Erreichung des Isoagglutininzieltiters genauer vorhergesagt werden kann als bei Anwendung des indirekten Coombstest (Valli et al. 2009). In künftigen Studien sollte auch eine Bestimmung der Isoagglutinititer gegen Erythrozyten des Organspenders (sog. Donorerythrozyten) anstatt Standarderythrozyten erwogen werden, da dadurch die interindividuelle Variabilität der Antigenexpression des Spenderorgans präziser abgebildet wird (Sassi et al. 2011). So wurde gezeigt, dass der quantitative Unterschied der Antigenexpression auf den Erythrozyten beispielsweise in der Niere reflektiert wird (Breimer und Samuelsson 1986). Zudem sind in einigen Fällen die Isoagglutinititer gegen Donorerythrozyten signifikant geringer als gegen Standarderythrozyten. Daher sollten in Zukunft erstere verwendet werden, da sie den Isoagglutinititer vermutlich genauer widerspiegeln (Ahlenstiel et al. 2006).

## **6.2 Diskussion der Isoagglutinititerreduktion des Patienten- und Kontrollkollektivs**

Die präoperative Reduktion der Isoagglutinititer sowie das Aufrechterhalten niedriger Isoagglutinititer innerhalb der ersten Wochen nach AB0-inkompatibler Tx sind das gemeinsame Primärziel der weltweit verschiedenen Konditionierungsprotokolle (Boberg et al. 2006, Hanto et al. 2003).

In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass die Isoagglutinititer sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch die *Glycosorb®-AB0-Säulen* effektiv reduziert werden können. *In vitro* konnte eine Senkung um bis zu vier (IgM) bzw. sieben (IgG) Titerstufen erreicht werden, gleichzeitig blieb die Höhe der übrigen Immunglobuline, des Serumalbumins oder des Komplements unverändert (Rydberg et al. 2005). *In vivo* konnten in einer 2006 veröffentlichten Studie mit 15 AB0-inkompatiblen LDK-Tx sowohl die IgM- als auch die IgG-Isoagglutinine pro IA bei einer Spannweite von 0 bis 4 Titerstufen um 2 Titerstufen (Median) reduziert werden, wobei immunisierte sowie autoimmun erkrankte Patienten gegenüber einer Isoagglutininreduktion resistenter zu sein schienen als nichtimmunisierte Patienten (Kumlien et al. 2006).

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse stützen die Effektivität der *Glycosorb®-AB0-Säulen*: Für das Patientenkollektiv konnte eine absolute Isoagglutinititerreduktion um bis zu 4 Titerstufen und eine mediane Reduktion um eine Titerstufe nachgewiesen werden. Die mittlere Reduktion der Isoagglutinititer pro IA lag mit einem aTD zwischen 1,8 und 2,4 Titerstufen für die IgM-Isoagglutinine und einem

aTD zwischen 1,8 und 4,0 Titerstufen für die IgG-Isoagglutinine in etwa im Bereich der bei Wilpert et al. beschriebenen aTD-Werte, jedoch für die IgM-Isoagglutinine etwas niedriger. Interindividuelle Schwankungen der Titerreduktion könnten diesen Unterschied erklären. Interessanterweise zeigten sich auch bei Anwendung des nicht-isoagglutinspezifischen *Immunosorba®-Systems* im Kontrollkollektiv vergleichbar gute Ergebnisse mit maximalen Isoagglutinititerreduktionen pro IA von 2 bis 4 Titerstufen für die IgM-Isoagglutinine bzw. 1 bis 5 Titerstufen für die IgG-Isoagglutinine (je nach Patientengruppe). Die mediane Isoagglutinititerreduktion des Kontrollkollektivs lag wie die des Patientenkollektivs bei einer Titerstufe. Auch die mittlere Isoagglutinititerreduktion war mit aTD-Werten zwischen 1,0 und 4,0 Titerstufen für die IgM- bzw. 1,0 und 3,0 Titerstufen für die IgG-Isoagglutinine im Bereich der mit den *Glycosorb®-AB0-Säulen* möglichen Reduktion. Somit scheint die Effektivität der Isoagglutinititerreduktion beider Säulensysteme in dieser Arbeit verhältnismäßig gleich gut zu sein. Interessanterweise war im Kontrollkollektiv die mittlere Isoagglutinititerreduktion für die IgM-Isoagglutinititer größer und für die IgG-Isoagglutinititer kleiner als im Patientenkollektiv, obwohl das *Immunosorba®-Systems* nachweislich mehr IgG- als IgM-Immunglobuline entfernen kann (Belak et al. 1994). Da die Isoagglutinititerreduktion der Patientengruppen 1, 3 und 4 zudem annähernd gleich hoch war, kann davon ausgegangen werden, dass eine effektive Isoagglutinititerreduktion auch unabhängig von der jeweiligen Grunderkrankung möglich ist. Die niedrigste absolute (TD) und mittlere (aTD) Isoagglutinititerreduktion wurde in Gruppe 2 gemessen. Dies könnte einerseits mit den ohnehin niedrigen Isoagglutinititern zusammenhängen, die eventuell bereits nach wenigen IA optimal depletiert waren. Andererseits könnte auch die bei Kumlien et al. beschriebene gewisse Resistenz mancher Patienten gegenüber Isoagglutinineliminierung oder ein zu gering prozessiertes Plasmavolumen eine Rolle gespielt haben. Da in dieser Gruppe die mediane Isoagglutinititerreduktion wie im Patienten- und Kontrollkollektiv ebenfalls bei einer Titerstufe lag, kann aber insgesamt auch hier von einer effektiven Behandlung ausgegangen werden.

Um die Effektivität der Isoagglutinititerreduktion weiter zu quantifizieren, wurde für jeden Patienten die persönliche TRR bestimmt. Die TRR kann nach einer Immunadsorptionsbehandlungsserie v.a. zur abschließenden Beurteilung der Effektivität der Isoagglutinineliminierung berechnet werden. In einer 2007 von Wilpert et al. veröffentlichten Studie war sie bei Patienten, die den präoperativen Zieltiter von  $\leq 1:4$  vor AB0-inkompatibler Tx nicht erreichen konnten, signifikant geringer als die TRR der in der

Studie erfolgreich konditionierten Patienten, welche bei einem Wert von ca. 1,0 lag. Wird folglich als Cut-off-Wert für eine erfolgreiche Konditionierung mit Zieltiter  $\leq 1:4$  ein TRR-Wert von 1,0 angenommen, sind die TRR des Patientenkollektivs mit  $0,4 \pm 0,1$  bis  $0,9 \pm 0,1$  (RT) bzw.  $0,3 \pm 0,1$  bis  $1,4 \pm 0,6$  (GKT) im Nachhinein als verbesserungswürdig anzusehen. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in der Tatsache wieder, dass eine Patientin den präoperativen Zieltiter von  $\leq 1:4$  trotz neunmaliger IA nicht erreichen konnte. Allerdings lagen auch die TRR des Kontrollkollektivs in einem ähnlich niedrigen Bereich und hier konnte in keinem Fall eine TRR  $> 1,0$  erreicht werden. Somit scheint trotz insgesamt niedriger TRR in beiden Kollektiven die Verwendung der *Glycosorb®-AB0-Säulen* zur Isoagglutinintiterreduktion effektiver zu sein als die des *Immunosorba®-Systems*, da sich zudem die höchsten TRR im RT und im GKT in Gruppe 1 zeigten. Vor allem die Elimination der Anti-B-Isoagglutinine scheint bei den Patienten der Gruppe 1 und 3 schwierig gewesen zu sein, da sich hier die geringsten TRR aller Gruppen fanden. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die Eliminierung der Anti-A1, -A2 und -B-Isoagglutinine nicht homogen ist und für unterschiedliche Isoagglutinine eine unterschiedliche Effektivität ihrer Depletion zu erwarten ist. Die Berechnung der TRR sollte bei der Effektivitätsbeurteilung der IA jedoch nicht als einziges Bewertungskriterium herangezogen werden, sondern vielmehr als zusätzliches Hilfsmittel nach Abschluss der Behandlungsserie dienen.

Um die Effektivität der Isoagglutinindepletion zu optimieren, sollte in weiterführenden Studien erwogen werden die Leistungsfähigkeit der *Glycosorb®-AB0-Säulen* nicht nur durch Messung der Isoagglutinintiter im Patientenplasma zu evaluieren, sondern auch eine Bestimmung der Anti-A- bzw. Anti-B-Isoagglutinintiter im Fraktionsbeutel des Plasmapheresegeräts durchzuführen. Je höher der Titer im Fraktionsbeutel ist, desto mehr Isoagglutinine konnten entfernt werden. Auch eine *ex vivo* Bestimmung der posttherapeutischen Isoagglutinintiter im Patientenplasma, also nach Passage der *Glycosorb®-AB0-Säulen* und vor Retransfusion der Blutbestandteile zum Patienten, könnte zukünftig durchgeführt werden. Hierdurch werden immunologische Einflüsse, denen das Plasma im Patienten unterliegt, weitestgehend ausgeschlossen. Zeigen sich hierbei wiederholt Isoagglutinintiter  $\geq 1:8$ , kann davon ausgegangen werden, dass die Antikörpereliminierung unvollständig ist oder die Effizienz der Säulen nachlässt (Genberg et al. 2011).

Leider konnte in der vorliegenden Arbeit die Effektivität der Isoagglutinintiterreduktion bei doppeltem Antigenmismatch (Transplantatempfänger Blutgruppe 0, Lebendspender

Blutgruppe AB) nicht untersucht werden, da es keine solche Spender-Empfängerkonstellation im Patientenkollektiv gab. Bei diesen Patienten müssen sowohl die Anti-A1-/Anti-A2- als auch die Anti-B-Isoagglutinine eliminiert werden. Um eine simultane Depletion zu ermöglichen müsste also eine Konnektion der *Glycosorb®-A-* und *Glycosorb®-B-Säule* vorgenommen werden, damit nicht zwei einzelne IA durchgeführt werden müssen. Wie effektiv in diesem Falle die Isoagglutinintiterreduktion ist, muss an anderer Stelle evaluiert werden.

Zuletzt sollte beachtet werden, dass einigen Personen sogenannte „core-chain-dependent“-IgM- und IgG-Isoagglutinine besitzen, die durch die *Glycosorb®-AB0-Säulen* nur unzureichend eliminiert werden (Rydberg et al. 1992). Hierbei handelt es sich um eine Untergruppe der Isoagglutinine, bei denen das zugehörige Antigenepitop nicht nur aus den terminalen AB0-Trisacchariden, sondern zusätzlich auch aus Teilen der Oligosaccharidkernketten der AB0-Antigene gebildet wird (Lindberg et al. 2011). Da vier verschiedene Oligosaccharidkernketten existieren, entstehen vier A/B-Antigensubtypen. Die Prävalenz dieser Antikörper ist weitestgehend unbekannt und betrug in Lindbergs Studie an gesunden Blutspendern ca. 13 %. Die Existenz dieser Antikörper hat somit eine nicht zu unterschätzende klinische Relevanz hinsichtlich AB0-inkompatibler Tx, da bei Verwendung der *Glycosorb®-AB0-Säulen* nur Isoagglutinine entfernt werden, die gegen die terminalen Trisaccharide der AB0-Antigene gerichtet sind.

### **6.3 Diskussion des Wiederanstiegs der Isoagglutinintiter zwischen zwei Immunadsorptionen**

Ein Wiederanstieg der Isoagglutinintiter zwischen zwei aufeinander folgenden IA, auch als Titerrebound bezeichnet, konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl im Patienten- als auch im Kontrollkollektiv beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um ein allgemein und weithin bekanntes Problem, dass in zahlreichen Studien als eine Form der Therapierefraktärität unabhängig von der Art des verwendeten Hämaphereseverfahrens (IA, TPA, DFPP) belegt ist (Boberg et al. 2006, Wilpert et al. 2007). Die Quantifizierung des Titerrebounds zwischen den einzelnen Transplantationszentren wird dabei v.a. durch die Tatsache erschwert, dass bisher keine einheitliche Definition existiert (Genberg et al. 2011). Ein Titerrebound stellt die Transplantationszentren nicht nur vor ein immunologisches, sondern auch vor ein ökonomisches Problem, da eine erhöhte Anzahl an IA weitere physische und psychische Belastungen für den Patienten sowie zusätzliche



Kosten für die Klinik bedeuten. Bereits in einer frühen Studie zur Anwendung der *Glycosorb®-AB0-Säulen* konnte ein Titerrebound verzeichnet werden, wobei eine Mobilisation von Isoagglutininen vermutet wurde und infolgedessen die Anzahl präoperativer IA erhöht werden musste (Tyden et al. 2006). Im schlimmsten Fall führt ein Titerrebound sogar zum Abbruch der Konditionierungstherapie und dem Absagen der Tx. Dieser Fall trat auch in der vorliegenden Arbeit bei einer Patientin nach neun präoperativen IA ein. Da die Kosten einer AB0-inkompatiblen Tx um ein vielfaches höher liegen als die einer AB0-kompatiblen (Genberg et al. 2008) und ein Titerrebound die Anzahl der IA erhöhen kann, sollte nicht nur die effektive Isoagglutinin-titerreduktion, sondern auch die Verhinderung eines Titerrebounds im Mittelpunkt der Konditionierungstherapie stehen.

Um den Wiederanstieg der Isoagglutinititer quantifizieren zu können, wurden für Patienten- und Kontrollkollektiv TI und aTI bestimmt. Der Wiederanstieg im Patientenkollektiv kann mit einem TI von maximal 4 Titerstufen (IgM und IgG) sowie einem maximalen aTI zwischen 1,0 und 2,5 Titerstufen für die IgM- sowie zwischen 2,0 und 2,5 Titerstufen für die IgG-Isoagglutinine als hoch bewertet werden, da ein aTI von > 2,0 Titerstufen laut Wilpert et al. als hoher Titerrebound bezeichnet wird. Der mediane Wiederanstieg der Isoagglutinititer lag sowohl im Patienten- als auch im Kontrollkollektiv bei einer Titerstufe und damit im Bereich einer vergleichbaren Studie AB0-inkompatibel transplanterter Patienten (Genberg et al. 2011). Im Kontrollkollektiv war der absolute Wiederanstieg der Isoagglutinititer für die IgG-Isoagglutinine mit einem TI von maximal 6 Titerstufen und einem aTI zwischen 1,0 und 4,0 Titerstufen sogar noch höher als der des Patientenkollektivs, der Wiederanstieg der IgM-Isoagglutinine war hingegen in etwa mit dem des Patientenkollektivs vergleichbar.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Wiederanstieg der Isoagglutinititer zwischen zwei IA ein verbreitetes immunologisches Phänomen darstellt. Die hohen TI- und aTI-Werte des Kontrollkollektivs sind dabei vermutlich durch die jeweiligen Grunderkrankungen der Patienten bedingt. Da in der Pathogenese des SLE und der ITP Antikörper eine tragende Rolle spielen (Arastéh 2009), es im Rahmen der B-ALL zu einer abnormen Antikörpersynthese kommen kann (Teachey und Felix 2005) und auch beim MDS ein fehlgesteuertes Immunsystem eine Rolle spielt (Sloand und Rezvani 2008), muss bei diesen Patienten und bei den Patienten mit irregulären Antikörpern (Gruppe 3) von einem veränderten bzw. überaktiven Immunsystem ausgegangen werden. Es könnte hier eventuell zu einer schnelleren Resynthese von Isoagglutininen durch B-Zellen oder zu einem schnelleren Konzentrationsausgleich der IgG-Isoagglutinine zwischen intravasalem und

extravasalem Kompartiment mit konsekutivem Titerrebound kommen. Interessanterweise zeigten erneut die Patienten der Gruppe 2 die niedrigsten TI und aTI-Werte, obwohl einige von ihnen aufgrund hochtitriger HLA-Antikörpertiter nachweislich als immunisiert anzusehen sind und somit ein höherer Titerrebound erwartet wurde. Warum gerade diese Patienten dennoch den geringsten Titerrebound aufwiesen und ob dies durch die jahrelange immunsuppressive Therapie nach AB0-kompatibler Tx sowie durch die intensiverte immunsuppressive Rejektionstherapie bedingt ist, bleibt letztlich unklar.

Schwierig zu interpretieren zeigen sich auch der prä- und postoperative Titerrebound des Patientenkollektivs. Alle Patienten erhielten eine intensiverte Immunsuppressionstherapie und drei von ihnen waren darüber hinaus mit *Rituximab* vorbehandelt, einem monoklonalen Anti-CD20-Antikörper, der eigentlich der selektiven B-Zell-Depletion dient und zur Prophylaxe des Isoagglutinintiterrebounds eingesetzt wird (Egawa et al. 2007). Da die Resynthese der Isoagglutinine durch die immunsuppressiven Medikamente eigentlich unterdrückt werden soll, wiegt der hohe Titerrebound des Patientenkollektivs umso schwerer. Die Faktoren, die trotz intensiver Immunsuppression zum Titerrebound führen, sind hierbei nur teilweise bekannt. So kann beispielsweise eine Unterbrechung der Hämapheresetherapie die Antikörperproduktion nicht nur stimulieren, sondern auch beschleunigen (Dau 1995). Da bei keinem der 25 untersuchten Patienten die Immunadsorptionsbehandlung unterbrochen wurde, kann dies als Ursache des Titerrebounds ausgeschlossen werden. Vermutlich spielen hier eher immunisierende Prozesse durch Transfusionen und Schwangerschaften eine tragende Rolle. Weiterer Grund für einen präoperativen Wiederanstieg der Isoagglutinintiter kann auch die Applikation von IVIG sein. Diese können die IgG-Isoagglutinintiter nachweislich um bis zu zwei Titerstufen erhöhen, weshalb stets ein Präparat ausgewählt werden sollte, dass selbst wenig Isoagglutinine enthält (Valli et al. 2009). Da laut Jenaer Konditionierungsprotokoll IVIG präoperativ jedoch nur einmalig appliziert werden, kann dieses Therapieregime nicht allein für den Titerrebound verantwortlich gemacht werden. Zudem sind IVIG nicht in der Lage die IgM-Isoagglutinintiter zu erhöhen und ihre hochdosierte Applikation (min. 0,6 g/kg KG) stellt in Kombination mit Hämapherese sogar eine in Studien belegte Therapieform des Titerrebounds dar (Ikegami et al. 2007). Dabei sollen die IVIG durch ihre immunmodulatorischen Wirkungen wie B-Zellapoptose und Komplementinhibition den Wiederanstieg der Isoagglutinintiter dämpfen, wobei der IVIG-induzierte Abfall der Isoagglutinintiter einer klonalen Erschöpfung antikörperproduzierender B-Lymphozyten zugeschrieben wird (Urbani et al. 2007). Als weiterer Grund für einen Titerrebound trotz

effektiver Immunsuppression wird eine T-Zell-unabhängige Isoagglutininproduktion durch die B-Zellen intestinaler Lymphknoten diskutiert (Ishida et al. 2000). Auch isoagglutininproduzierende CD20-negative Plasmazellen, die durch *Rituximab* nicht depletiert werden können, könnten ein Grund sein (Sonnenday et al. 2004). Die Tatsache, dass in den ersten drei Wochen nach der Applikation von *Rituximab* kein signifikanter Effekt auf die Höhe der donorspezifischen Isoagglutinititer beobachtet werden konnte, stützt diese Hypothese (Valli et al. 2009, Genberg et al. 2011). Zudem spielt auch der Zeitpunkt der *Rituximab*-Gabe eine entscheidende Rolle, da die präoperative Applikation von weniger als einer Woche vor Tx trotz nachweislich fehlender CD20-positiver B-Zellen einen Rebound der Isoagglutinititer nicht verhindern konnte (Ikegami et al. 2007). In der vorliegenden Dissertation erfolgte die Gabe vier Wochen vor LDK-Tx, sodass ein falscher Applikationszeitpunkt als Einflussfaktor ebenfalls ausgeschlossen werden kann. Der beobachtete Titerrebound scheint somit von weiteren, bisher ungeklärten Faktoren abzuhängen. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse kann postuliert werden, dass ein Titerrebound durch die derzeitigen Konditionierungsprotokolle nicht verhindert werden kann. Es handelt sich hierbei jedoch um ein Problem, welches es unbedingt zu lösen gilt, da ein Rebound zu physischen, psychischen und ökonomischen Belastungen des Patienten und des Transplantationszentrums führt. Eine Lösungsmöglichkeit, die erwogen werden sollte, stellt die Applikation des zytotoxischen Medikaments Cyclophosphamid dar (Ishida et al. 2003). Dieses könnte die antikörperproduzierenden Zellen, die von *Rituximab* und anderen Immunsuppressiva nicht reduziert werden, abtöten.

#### **6.4 Einfluss des Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens auf die Isoagglutinititerreduktion**

Um die Isoagglutinititer eines Patienten effektiv reduzieren zu können, spielt auch die Menge des pro IA prozessierten Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumens ( $PV_{Hct}$ ) eine Rolle. Bei der Durchführung einer Immunadsorptionsbehandlung wird dabei normalerweise das zuvor berechnete Zielplasmavolumen (Kaplan 1990) mehrfach prozessiert, da davon ausgegangen wird, dass ein höheres Plasmavolumen zu einer höheren Abreicherung der Antikörper führt (Gjörstrup und Watt 1990). So wird im Normalfall das 1,5- bis 2,5-fache Plasmavolumen des Patienten behandelt. Bei Verwendung des *Immunosorba®-Systems* sollte zumindest in der ersten IA einer Behandlungsreihe das 2,5-fache Plasmavolumen (das errechnete, zirkulierende  $PV_{Hct}$  des Patienten) behandelt

werden (Kiefel 2010). Auch bei Verwendung der *Glycosorb®-AB0-Säulen* sollen nach Auskunft der Firma Glycorex Transplantation AB (siehe Anhang) die Isoagglutinine umso stärker abfallen, je mehr Plasma prozessiert wird. Hierbei schwanken die Empfehlungen zwischen dem 2,0- bis 3,0-fachen  $PV_{Hct}$  pro IA (Kumlien et al. 2006, Geyer et al. 2009). Um eine Empfehlung hinsichtlich des pro IA zu prozessierenden optimalen  $PV_{Hct}$  abgeben zu können, wurde mit Hilfe verschiedener statistischer Tests der Einfluss des behandelten  $PV_{Hct}$  der Patienten auf deren Isoagglutinititerreduktion untersucht.

Mit Hilfe einer Korrelationsanalyse sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob und welcher Zusammenhang zwischen dem pro IA behandelten  $PV_{Hct}$  und der Isoagglutinititerreduktion der Patienten bestand. Für den überwiegenden Teil der IA ließ sich weder für die absolute noch für die durchschnittliche Isoagglutinititerreduktion ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem  $PV_{Hct}$  erkennen. Vermutlich ist dies jedoch weniger einem tatsächlich fehlenden Zusammenhang, als vielmehr einer zu geringen Probandenzahl von sechs bis sieben Patienten pro Patientengruppe geschuldet. Auch die Tatsache, dass aufgrund der unterschiedlichen Blutgruppen der Patienten eine zu geringe und zudem variierende Anzahl an Isoagglutinititerreduktionen in die Analyse einging, dürfte eine entscheidende Rolle gespielt haben.

Im Patientenkollektiv zeigten sich nur für die mittlere Isoagglutinititerreduktion zwei signifikante Ergebnisse, jedoch in unterschiedlichen IA. Zwischen  $PV_{Hct}$  und IgM-Isoagglutinititerreduktion bestand ein stark negativer Zusammenhang, sodass hier die IgM-Abreicherung umso geringer war, je mehr  $PV_{Hct}$  behandelt wurde. Für die mittlere IgG-Isoagglutinititerreduktion bestand ein stark positiver Zusammenhang, sodass hier die IgG-Abreicherung umso höher war, je mehr  $PV_{Hct}$  behandelt wurde. Dies deutet darauf hin, dass sich die IgM- und IgG-Isoagglutinine bezüglich ihrer Eliminierung unterschiedlich verhalten könnten. Die Entfernung der Isoagglutinine hängt nachweislich u.a. von ihrer Verteilung zwischen intravasalem und extravasalem Kompartiment sowie ihrer Fähigkeit sich zwischen diesen zu bewegen ab, sodass die Immunglobulinklasse der Isoagglutinine eine entscheidende Rolle bei der Konditionierungstherapie spielt (Winters et al. 2004). So soll IgM, das sich nicht beliebig zwischen den beiden Kompartimenten bewegen kann, mittels Hämaphereseverfahren effektiver reduzierbar sein als IgG, das sich laut Meinung einiger Autoren (Derksen et al. 1984) entlang eines Konzentrationsgradienten zwischen den Kompartimenten bewegt. Hiermit könnte erklärt werden, warum die mittlere IgG-Isoagglutinititerreduktion mit steigendem  $PV_{Hct}$  verbessert wird, die mittlere IgM-Isoagglutinititerreduktion jedoch nicht. Da im

Patientenkollektiv jedoch nur zwei statistisch signifikante Korrelationen gefunden werden konnten, sollten die hier gewonnenen Ergebnisse nicht leichthin verallgemeinert werden.

Auch in Gruppe 3 des Kontrollkollektivs zeigte sich die absolute Isoagglutinintiterreduktion umso geringer je höher das  $PV_{Hct}$  war, diesmal jedoch sowohl bei den IgM- als auch bei den IgG-Isoagglutininen. In Gruppe 2 zeigte sich in der ersten IA für die absolute IgM- und IgG-Isoagglutinintiterreduktion der gleiche Zusammenhang wie im Patientenkollektiv, jedoch war der Zusammenhang in der zweiten IA genau umgekehrt, sodass die Ergebnisse insgesamt widersprüchlich erscheinen. Für die mittlere Isoagglutinintiterreduktion zeigten sich ebenfalls uneinheitliche Ergebnisse. So überwogen bei der IgM- die positiven, bei der IgG-Isoagglutinintiterreduktion die negativen Korrelationen. Somit müsste für die Eliminierung der IgM-Isoagglutinine ein höheres  $PV_{Hct}$  gewählt werden, während für die Reduktion der IgG-Isoagglutinine ein niedrigeres  $PV_{Hct}$  empfehlenswert wäre. Da aber davon ausgegangen wird, dass unabhängig von der verwendeten IA-Säule ein höheres prozessiertes Plasmavolumen zu einer größeren Isoagglutinintiterreduktion führt, widerspricht dieses Ergebnis dem des Patientenkollektivs. Außerdem konnte eindeutig bewiesen werden, dass bei Verwendung des *Immunosorba®*-Systems ein höheres Plasmavolumen zu einer höheren Abreicherung der IgG-Antikörper führt (Belak et al. 1994), was sich in den hier gewonnenen Ergebnissen nicht widerspiegelt. Inwiefern die in dieser Arbeit gefundenen Zusammenhänge somit die realen Verhältnisse zwischen  $PV_{Hct}$  und Isoagglutinintiterreduktion darstellen, bleibt somit diskutabel.

Auch die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests bezüglich des Einflusses einer bestimmten Menge an  $PV_{Hct}$  auf die durchschnittliche Isoagglutinintiterreduktion waren größtenteils statistisch nicht signifikant. Lediglich für die IgG-Isoagglutinine der 6. IA aller Patienten konnte gezeigt werden, dass ein behandeltes  $PV_{Hct}$  zwischen 1,50 und 1,99 L zu einer größeren durchschnittlichen Isoagglutinintiterreduktion führt als ein höheres  $PV_{Hct}$  ( $\geq 2,00$  L). Aufgrund der geringen Anzahl an Signifikanzen und der Tatsache, dass der Kruskal-Wallis-Test in drei Fällen (GKT 1. IA; RT 3. IA und 6. IA) nur gering über dem Signifikanzniveau von 0,05 lag (p-Werte 0,076, 0,094 und 0,090 für o.g. IA), wurden für diese drei Fälle probatorisch ebenfalls Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Hierbei mussten bei der  $\alpha$ -Adjustierung nach Holm-Schaffer die Signifikanzschranken aus Tabelle 6 zugrunde gelegt werden. Es zeigte sich auch für die durchschnittliche IgG-Isoagglutinintiterreduktion der 1. IA ein ähnliches Ergebnis wie in der 6. IA, da hier erneut ein statistisch signifikanter Unterschied zugunsten des niedrigeren  $PV_{Hct}$  mit  $p = 0,013$

bestand (Tabelle 19). Aufgrund der o.g. fehlenden Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test ist dieses Ergebnis jedoch mit Vorbehalt zu bewerten. Diese zwei Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass für IgG-Isoagglutinine ein  $PV_{Hct} < 2,00$  L gewählt werden sollte, was erneut den Ergebnissen von Gjörstrup und Watt widerspricht. Hierbei ist anzumerken, dass die Grenzen für die Plasmagruppen (0 bis 1,49 L; 1,5 bis 1,99 L;  $\geq 2,00$  L) willkürlich gewählt wurden und die Analyse bei anderen Schranken vielleicht anders ausgefallen wäre. Für alle übrigen IA ließ sich kein signifikanter Einfluss der Höhe des  $PV_{Hct}$  auf die durchschnittliche Isoagglutinititerreduktion ermitteln, da vermutlich die Probandenzahl und der Anteil der Patienten, die überhaupt mit einem  $PV_{Hct}$  von  $\geq 2,00$  L behandelt wurden, insgesamt zu gering war. So wurde lediglich in 27,8 % (42/151 IA) der durchgeführten IA mehr als 2,00 L  $PV_{Hct}$  behandelt, im Patientenkollektiv lag der Anteil bei 9,4 % (5/53 IA), im Kontrollkollektiv bei 37,6 % (37/98 IA). Auch lag das behandelte  $PV_{Hct}$  im Patientenkollektiv mit 1,6 L (Median) und im Kontrollkollektiv 1,9 L (Median) genau im Bereich der mittleren Plasmagruppe (1,5 bis 1,99 L). Somit war die Verteilung der IA auf die gebildeten Plasmagruppen vermutlich zu inhomogen um statistisch signifikante Ergebnisse erbringen zu können. Durch die Berechnung der Odds-Ratios konnte festgestellt werden, dass in drei IA tendenziell die Chance einer durchschnittlichen Isoagglutinititerreduktion von  $\geq 2,5$  gesenkten Titerstufen größer war, wenn  $\geq 2,00$  L  $PV_{Hct}$  behandelt wurde. In einer anderen IA zeigten sich wieder umgekehrte Chancenverhältnisse. Da insgesamt jedoch zu wenige Probanden und zu wenige Immunadsorptionsbehandlungen mit  $\geq 2,00$  L prozessierten  $PV_{Hct}$  in die Analyse einfließen, waren diese Ergebnisse erneut statistisch nicht signifikant. Sie besitzen daher nur eine geringe Aussagekraft.

Trotz der durchgeführten Analysen kann an dieser Stelle keine Empfehlung hinsichtlich des optimal pro IA zu prozessierenden  $PV_{Hct}$  ausgesprochen werden. Anhand klinischer Erfahrung und verschiedener Studien scheint die Erhöhung des  $PV_{Hct}$  die Effektivität der Isoagglutinititerreduktion zu erhöhen, was durch die vorliegende Arbeit jedoch nicht bestätigt werden konnte. Es wird daher empfohlen gleiche oder ähnliche Analysen sowohl für das Patienten- als auch für das Kontrollkollektiv mit einer höheren Probandenzahl zu wiederholen. Wichtig ist dabei v.a., den Anteil der Patienten, die mit mehr als 2,00 L  $PV_{Hct}$  behandelt wurden, zu erhöhen. Weiterhin ist darauf zu achten, dass in jede untersuchte Plasmagruppe eine gleich hohe Anzahl von Behandlungen eingeht, was im Rahmen dieser Arbeit leider auch nicht der Fall war. Zudem sollten zukünftig vorzugsweise Patienten derselben Blutgruppe für die Studie verwendet werden. Damit wäre gewährleistet, dass in

die statistische Analyse, die die absolute Isoagglutininintiterreduktion der Anti-A1,-A2 und -B-Isoagglutinine betrifft, stets die gleiche Anzahl an Werten einfließt.

Die Effektivität der Isoagglutinindepletion kann auch auf andere Art und Weise gesteigert werden. So ist beispielsweise die Anwendung von zwei *Glycosorb®-AB0-Säulen* im Sinne einer Doppelfiltrationsapherese wie beim *Immunosorba®-System* zur verbesserten Antikörpereliminierung empfehlenswert. Die dafür nötige Säulenelution erwies sich bereits mehrfach als klinisch praktikabel, es wird eine bis zu sechsfache Wiederverwendung der Säulen ermöglicht (Kumlien et al. 2006). Die daraus resultierende Kostenersparnis bei einem Preis der *Glycosorb®-AB0-Säulen* von 3.700 Euro pro Stück (zum Zeitpunkt der Datenerhebung) bietet dabei auch einen ökonomischen Vorteil. Gerade bei Patienten mit doppeltem Antigenmismatch muss eine Doppelfiltrationsapherese erwogen werden. Allerdings muss bedacht werden, dass sich die Anzahl an Säulenwechseln (Zyklen) bei Doppelfiltrationsapherese und steigendem  $PV_{Hct}$  erhöht und jeder Säulenwechsel mit einem Elutionsprozess einhergeht. Die Elution hat dabei direkte Auswirkungen auf das Patientenplasma, welches verdünnt wird, teilweise verloren geht sowie auf die Plasmaalbuminkonzentration, die um bis zu 15 % sinken kann (Matic et al. 2000).

## **6.5 Die Rolle des Ausgangstiters vor Immunadsorption für die Anzahl der durchgeführten Immunadsorptionen**

Eine wichtige Rolle bei der Isoagglutininintiterreduktion durch Hämapherese scheint auch die Höhe des Isoagglutinin titers vor erster IA (Ausgangstiter) zu spielen. Patienten mit hohen Ausgangstitern weisen ein erhöhtes Risiko auf den präoperativen Isoagglutininzieltiter nicht zu erreichen, wobei dies entweder durch einen hohen Titerrebound oder durch die Persistenz hoher Isoagglutinin titers trotz vermehrter IA bedingt sein kann (Tyden et al. 2007). So benötigten Patienten mit IgG-Isoagglutinin titern  $> 1:128$  sowohl beim Einsatz von IA als auch DFPP perioperativ signifikant mehr Behandlungen als Patienten mit niedrigeren Titern (Shimmura et al. 2000). Es wurde vermutet, dass diese Patienten High-Responder sind, die dazu neigen sofort nach der Behandlung neue Isoagglutinine zu bilden. Ob dies auch für IgM-Isoagglutinine gilt, blieb in der Studie offen. In vielen Zentren wird daher bei Patienten mit hohen Ausgangstitern bereits präoperativ eine größere Anzahl an IA eingeplant oder es werden zusätzliche Hämaphereseverfahren wie TPA oder DFPP eingesetzt (Sassi et al. 2011). In einer 2008 veröffentlichten Fallstudie zeigte sich abermals die Abhängigkeit der Anzahl benötigter

präoperativer IA vom Ausgangstiter, Patienten mit niedrigeren Ausgangstitern benötigten hier erneut weniger IA (Hugo et al. 2008). Da bisher kein einheitlicher Wert für den Terminus „hoher Isoagglutinititer“ existiert, wurde in dieser Arbeit der bei Wilpert et al. beschriebene Wert von  $> 1:128$  zu Grunde gelegt.

Der Anteil an Patienten mit hohem Ausgangstiter lag in der vorliegenden Arbeit bei 36,0 % (9/25 Patienten) und somit um einige Prozent niedriger als der des Patientenkollektivs bei Wilpert et al. Die meisten dieser Patienten fanden sich hierbei in Gruppe 1, also in der Gruppe, in der sich bereits der höchste durchschnittliche Ausgangstiter (1:1536 im GKT) aller 25 Patienten und der größte prätherapeutische IgM-Titer messen ließen. Doch auch die Patienten der Gruppen 3 und 4 wiesen die erwarteten hohen Ausgangstiter auf. Interessanterweise zeigten erneut die Patienten der Gruppe 2, welche ebenfalls als „immunisiert“ anzusehen sind, keine hohen Ausgangstiter. Diese Gruppe hatte also im Großteil der durchgeführten Untersuchungen eine Sonderstellung inne, da hier die niedrigsten prätherapeutischen Isoagglutinititer, die niedrigste absolute und mittlere Isoagglutinititerreduktion sowie der niedrigste Titerrebound gemessen wurden. In allen Fällen wird ein Zusammenhang mit der durchgeführten Immunsuppressionstherapie sowie der Geschlechterverteilung (rein männliche Patientengruppe) vermutet.

Auch in der vorliegenden Arbeit benötigten Patienten mit hohen Ausgangstitern ( $> 1:128$ ) mehr IA als Patienten mit normalen Ausgangstitern ( $\leq 1:128$ ), jedoch war dieses Ergebnis nicht statistisch signifikant, sodass es lediglich als Tendenz gewertet werden kann. Im Patientenkollektiv benötigten die Patienten mit hohen Ausgangstitern durchschnittlich mehr IA vor ihrer AB0-inkompatiblen Tx als die Patienten mit normalen Ausgangstitern, sodass dies auf einen Einfluss des Ausgangstiters auf die Anzahl der IA hinweist. Da sich jedoch im Patientenkollektiv einmal die wenigsten (Patienten mit hohen Ausgangstitern) und einmal die meisten (Patienten mit normalen Ausgangstitern) durchgeführten IA aller Patientengruppen fanden, scheinen die Ergebnisse insgesamt inkonsistent. Dies könnte auf interindividueller Variabilität beruhen und deckt sich mit der Meinung derjenigen Autoren, die vermuten, dass die Höhe des Ausgangstiters weder die genaue Anzahl der IA, den Erfolg der Konditionierungstherapie noch das Outcome einer AB0-inkompatiblen Tx mit Sicherheit vorhersagen kann (Donauer et al. 2006). Zudem sind zahlreiche Fälle beschrieben in denen Patienten mit normalen Ausgangstitern den festgelegten Zieltiter nicht erreichen konnten (Geyer et al. 2009).



Im Kontrollkollektiv lag die durchschnittliche Anzahl durchgeführter IA wiederum bei den Patienten mit hohen Ausgangstitern ( $> 1:128$ ) höher als bei den Patienten mit normalen ( $\leq 1:128$ ) Ausgangstitern. Da sich im Kontrollkollektiv die Anzahl der durchgeführten IA jedoch nicht nach der Isoagglutininreduktion, sondern nach dem klinischen Ansprechen der jeweiligen Grunderkrankung bzw. der Eliminierung anderer Antikörper (wie HLA-Antikörper) richtete, sollte dieses Ergebnis kritisch betrachtet werden. Die Analyse sollte mit höherer Probandenzahl wiederholt werden, da sonst keine sicheren und statistisch signifikanten Aussagen getroffen werden können. Letztlich ist aufgrund der hohen Effektivität der *Glycosorb®-AB0-Säulen* aber auch bei hohen Ausgangstitern die Reduktion der Isoagglutinititer auf den Zielwert in den allermeisten Fällen gewährleistet. Benötigen Patienten mit normalen Ausgangstitern hierfür in den meisten Fällen eine drei- bis viermalige Anwendung, so kann der Zieltiter von  $\leq 1:8$  bei Patienten mit hohen Ausgangstitern normalerweise durch fünf bis sechs präoperativen Anwendungen erreicht werden (Norden et al. 2006). Dieses Ergebnis wird durch die vorliegende Arbeit bestätigt, da bis auf eine Patientin, die einen sehr hohen Titerrebound aufwies, alle Patienten erfolgreich konditioniert wurden. Dabei kann auch die Konditionierung des Patienten, der vorzeitig eine Kadaverspende erhielt, als effektiv angesehen werden. Auf eine statistische Überprüfung der Fragestellung, ob zwischen den vier Patientengruppen ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl benötigter IA besteht, musste aufgrund der geringen Stichprobengröße verzichtet werden. Die Rolle des Ausgangstiters für die Anzahl der IA und die Erreichung des präoperativen Zieltiters bleibt daher in zukünftigen Studien weiter zu evaluieren. Im Rahmen einer Konditionierungstherapie sollte aber stets bedacht werden, dass eine Erhöhung der Anzahl an IA einen hohen psychischen und physischen Stressfaktor für die Patienten und eine ökonomische Belastung für die Klinik darstellt. Daher empfiehlt es sich bereits vor Therapiebeginn festzulegen, unter welchen Konditionen die Entscheidung zum Abbruch einer Hämapheresetherapie getroffen wird.

## **6.6 Vergleich der *Glycosorb®-AB0-Säulen* mit dem *Immunosorba®-System* zur Isoagglutininreduktion vor AB0-inkompatibler Organtransplantation**

Die Eliminierung der Isoagglutinine vor AB0-inkompatibler Transplantation kann durch verschiedene Hämaphereseverfahren bewerkstelligt werden. Während in europäischen Zentren die Isoagglutininreduktion durch Einsatz der antigenspezifischen *Glycosorb®-*

*AB0-Säulen* bevorzugt wird, kommen in japanischen und amerikanischen Zentren v.a. die antigenunspezifische Doppelfiltrationsplasmapherese (DFPP) oder der therapeutische Plasmaaustausch (TPA) zur Anwendung (Beimler und Zeier 2007). Obgleich die IA mit *Glycosorb®-AB0-Säulen* das teuerste Eliminationsverfahren darstellt, scheint ihr Einsatz v.a. dadurch gerechtfertigt, dass TPA und DFPP aufgrund ihrer geringen Antigenspezifität mit dem Verlust wichtiger Plasmaproteine wie Gerinnungsfaktoren, Komplementfaktoren und Immunglobuline einen entscheidenden Nachteil aufweisen (Geyer et al. 2009). Das *Immunosorba®-System* hingegen wird im Rahmen von Transplantation seit geraumer Zeit v.a. zur Entfernung von HLA-Antikörpern vor AB0-kompatibler Tx (Palmer et al. 1989) sowie in der Therapie HLA-antikörperbedingter humoraler Rejektionen (Bosch 2005) eingesetzt. Ziel dieser Arbeit war es die klinische Effektivität der Isoagglutinin-titerreduktion vor AB0-inkompatibler Tx durch Einsatz der antigenspezifischen *Glycosorb®-AB0-Säulen* zu evaluieren, sie mit dem kostengünstigeren *Immunosorba®-System* zu vergleichen und so einen Beitrag zur Verbesserung des Jenaer Konditionierungsprotokolls zu leisten.

In verschiedenen Studien konnte bewiesen werden, dass die Anwendung der *Glycosorb®-AB0-Säulen* unabhängig von der Immunglobulin(sub)klasse zur signifikanten Reduktion der Isoagglutinine auf den gewünschten Zieltiter führt (Tyden et al. 2005). Die Technik ist leicht anwendbar, außerdem wird kaum Plasma verworfen. Auch die vorliegende Arbeit konnte die Effektivität der Säulen anhand der guten Ergebnisse der absoluten und durchschnittlichen Isoagglutinin-titerreduktion bestätigen. Fünf der sieben geplanten Patienten konnten erfolgreich für die AB0-inkompatible Tx auf den Zieltiter von  $\leq 1:4$  konditioniert werden. Nur bei einer Patientin führte ein erheblicher Titerrebound zum Abbruch der Konditionierungstherapie, in den anderen sechs Fällen konnte der Titerrebound mit Hilfe der Säulen beherrscht werden. Grundsätzlich muss bei der Konditionierung mit Hilfe der *Glycosorb®-AB0-Säulen* jedoch beachtet werden, dass zwar mediane Reduktionen der Isoagglutinititer von 81 % (IgM) bzw. 56 % (IgG) in der ersten IA möglich sind (Valli et al. 2009), die Effektivität der Behandlung für die IgG- und IgM-Isoagglutinititer in dieser Studie jedoch bereits nach der ersten Behandlung kontinuierlich abnahm. Die mediane Reduktion pro IA belief sich hier insgesamt auf ca. 30 % für die IgM- und auf ca. 20 % für die IgG-Isoagglutinititer, wobei für letztere eine signifikante Reduktion nur für die IgG-Subklassen IgG1, IgG2 und IgG3, nicht jedoch für IgG4, stattfand. Für Patienten, die hauptsächlich IgG-Isoagglutinine besitzen, wie es bei immunisierten Patienten der Fall ist, wäre dies als eindeutiger Nachteil der Säulen zu

werten. Es müsste bereits vor Therapiebeginn mit einer geringeren Effektivität der IA gerechnet werden. Anhand der in dieser Arbeit ermittelten TD und aTD-Werte lies sich jedoch zeigen, dass die IgM- und IgG-Isoagglutinititerreduktion des Patientenkollektivs in etwa gleich hoch war, sodass die Säulen hier unabhängig von der Immunglobulinklasse gleich effektiv arbeiteten. Obwohl nach wie vor keine Informationen hinsichtlich der Gesamtbindungskapazität der *Glycosorb®-AB0-Säulen* vorliegen (Kumlien et al. 2006), ist bei einmaliger Verwendung der Säulen nach Auskunft der Firma Glycorex Transplantation AB (siehe Anhang) selbst bei mehr als 10,0 L prozessiertem Plasma keine Sättigung der Säulen zu erwarten. Daher können die Säulen, obgleich laut Hersteller nur für den Einmalgebrauch zugelassen, in der Praxis bis zu sechs Mal wiederverwendet werden, wobei die Wiederverwendung laut Kumlien et al. als sicher und kostensparend gilt. Da die Säulen im Rahmen dieser Dissertation nur einmal verwendet wurden, war ein etwaiger Einfluss der Wiederverwendung auf die Isoagglutininreduktion von vorneherein ausgeschlossen. Ob die IgM- und IgG-Isoagglutinititerreduktion bei Wiederverwendung der Säulen gleich effektiv bleibt, konnte in der vorliegenden Studie somit nicht evaluiert werden und bleibt weiteren Studien vorbehalten. Als eindeutiger Nachteile der *Glycosorb®-AB0-Säulen* sind die kurze Haltbarkeit der Säulen (4 Monate), die hohen Kosten und die durch die Antigenspezifität bedingte fehlende simultane Eliminierung von Komplementfaktoren und HLA-Antikörper zu nennen. Da in der Studie von Valli et al. jedoch eine signifikante Reduktion von *Hämophilus influenzae*- und Pneumokokken-IgG-Antikörpern nachgewiesen werden konnte, muss die Antigenspezifität der Säulen neuerdings in Frage gestellt werden.

Theoretisch könnte auch das preisgünstigere *Immunosorba®-System* zur Isoagglutinindepletion verwendet werden (Thaiss 2009). Es eignet sich vor allem zur Reduktion von IgG-Isoagglutininen, da das Staphylokokkenantigen A mit hoher Affinität an IgG1, IgG2 und IgG4 bindet und somit eine Reduktion dieser Immunglobuline um 77 bis 98 % möglich ist. IgA und IgM können hingegen nur um 55 % bzw. 56 % reduziert werden (Kiefel 2010). Da es sich bei den Isoagglutininen nichtimmunisierter Patienten größtenteils um Immunglobuline der Klasse M handelt, wäre hier eine Titerreduktion in geringerem Maße zu erwarten als bei Verwendung der *Glycosorb®-AB0-Säulen*. Bei immunisierten Patienten spielen hingegen vor allem IgG-Isoagglutinine eine Rolle, sodass bei diesen das *Immunosorba®-System* sinnvoll eingesetzt werden könnte, vor allem wenn sie nachweislich weitere Antikörper wie beispielsweise HLA- oder HPA-Antikörper besitzen, bei denen es sich in der Regel ebenfalls um Immunglobuline der Klasse G

handelt. In dieser Arbeit zeigten sich die absolute und durchschnittliche Isoagglutinin-titerreduktion des *Immunosorba*®-Systems auf ähnlich gutem Niveau wie bei Verwendung der *Glycosorb*®-AB0-Säulen, auch wenn die TRR gering schlechter war. Da die mediane Isoagglutinin-titerreduktion des Patienten- und Kontrollkollektivs mit einer Titerstufe gleich hoch war, können beide Säulen als gleich effektiv angesehen werden. Somit wäre der Einsatz des *Immunosorba*®-Systems vor AB0-inkompatibler Tx theoretisch gerechtfertigt. Allerdings muss bedacht werden, dass die hier untersuchten Patienten alle als immunisiert anzusehen sind und daher hohe IgG-Titer aufwiesen, die durch das *Immunosorba*®-System besser als die IgM-Titer reduziert werden können. Gegebenenfalls sollte daher zunächst die IgM-Isoagglutinin-titerreduktion durch das *Immunosorba*®-System an einer nichtimmunisierten Kontrollgruppe reevaluiert werden. Zur Entscheidungsfindung, welche Säule bei welchem Patienten am besten eingesetzt werden sollte, könnte eine Bestimmung der IgM- und IgG-Isoagglutinin-titer sowie irregulärer Antikörper vor Beginn der Konditionierungstherapie dienen.

Ein letzter wichtiger Punkt, der gegen den Einsatz der isoagglutinin-spezifischen *Glycosorb*®-AB0-Säulen zur Konditionierung vor AB0-inkompatibler Tx spricht, ist die nachweisliche Existenz zahlreicher anderer Antikörper, die im Rahmen von Tx eine Rolle spielen. So sollte beispielsweise auch das humane Leukozytenantigen-system (HLA-System) als zweites Haupthistokompatibilitätssystem des Menschen im Rahmen AB0-inkompatibler Tx mehr Berücksichtigung finden. Jedoch ist dies in vielen Transplantationszentren nicht der Fall. Auch in der vorliegenden Arbeit spielte der HLA-Antigenmismatch im Patientenkollektiv keine Rolle. Die Wichtigkeit des HLA-Systems im Rahmen AB0-kompatibler Tx wurde mehrfach unterstrichen und dabei der negative Einfluss gebildeter HLA-Antikörper auf Transplantatfunktion und -überleben herausgearbeitet (Patel und Terasaki 1969). So entwickeln sich bei bis zu ca. 25 % der Patienten nach AB0-kompatibler Nierentransplantation HLA-Antikörper (Sis und Halloran 2010). Eine Assoziation zwischen donorspezifischen HLA-Antikörpern und vaskulärer Rejektion wurde in klinischen Studien mehrfach dokumentiert (Halloran et al. 1992), da diese zu komplementvermittelter und antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität mit konsekutiver Rejektion führen (Vongwiwatana et al. 2003). Darüber hinaus kann auch die *de novo* Synthese von nicht-donorspezifischen HLA-Antikörpern stattfinden (Cai et al. 2006), welche hinsichtlich des Transplantatüberlebens genauso signifikant wie donorspezifische HLA-Antikörper zu sein scheinen (Hourmant et al. 2005).

Doch auch nicht-HLA-Antikörper, die im Rahmen solider Organtransplantationen bereits mehrfach beschrieben wurden, sollten intensiver berücksichtigt werden. Bei den korrespondierenden Antigenen kann es sich beispielsweise um das „Major histocompatibility class I chain-related gene A“ (MICA) und das „Major histocompatibility class I chain-related gene B“ (MICB) (Zou et al. 2006), die Gluthation-S-Transferase T1 (Aguilera et al. 2008), den Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 (AT<sub>1</sub>R) (Dragun et al. 2005), endotheliale Zellantigene (Praprotnik et al. 2001) oder Vimentin (Carter et al. 2005) handeln. So wirken MICA-Antigene nachweislich immunologisch und sind in AMR und Allograftversagen involviert (Zou et al. 2007). In jüngster Zeit sind auch die AT<sub>1</sub>R-Antikörper, vornehmlich IgG1- und IgG3-Allo- oder Autoantikörper, in den Fokus der Transplantationszentren gerückt. Sie können sowohl komplementfixierend als auch nicht-komplementfixierend sein und durch Schwangerschaften, Transfusionen und Transplantationen gebildet werden (Reinsmoen et al. 2010). Es handelt sich um agonistische Antikörper (AT<sub>1</sub>R-AA), die den AT<sub>1</sub>R stimulieren und dabei Mediatoren der Inflammation und Thrombose induzieren (Dragun 2007). Patienten mit AT<sub>1</sub>R-AA-bedingten Rejektionen wiesen in dieser Studie eine signifikant kürzere Transplantatüberlebenszeit als Patienten mit HLA-antikörperbedingten Rejektionen auf. Die Bedeutung von Nicht-HLA-Antikörper wird auch dadurch verdeutlicht, dass in einer Studie trotz Serumanalyse auf HLA-Antikörper, AT<sub>1</sub>R-Antikörper und MICA-Antikörper in 7 von 10 Fällen das Auftreten früher AMR-Episoden ungeklärt blieb (Amico et al. 2008). Es wird daher vermutet, dass noch weitere, unbekannte Antigene als Ziel von nicht-HLA-Antikörpern dienen. Weiterhin unklar sind jedoch Inzidenz und Prävalenz dieser Antikörper. Obwohl diese bisher nur im Rahmen AB0-kompatibler Tx beschrieben sind, spielen sie mit großer Wahrscheinlichkeit auch im Rahmen AB0-inkompatibler Tx eine Rolle. Da sie durch Verwendung der isoagglutininspezifischen *Glycosorb®-AB0-Säulen* nicht entfernt werden können, ist dies als weiterer großer Nachteil der Säulen zu werten. Antigenunspezifische Verfahren wie TPA, DFPP oder die Anwendung des *Immunosorba®-Systems* könnten diese Antikörper vermutlich bei weitem zuverlässiger eliminieren. Ob und wie auf diese vielfältigen Antikörper getestet wird, liegt dabei aber im Ermessen des jeweiligen Transplantationszentrums und schlussendlich richtet sich die Auswahl des passenden Eliminationsverfahrens vor AB0-inkompatibler Tx v.a. nach der persönlichen Erfahrung und Fachkenntnis des jeweiligen Transplantationszentrums.

## 7 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte die Effektivität der *Glycosorb®-AB0-Säulen* zur Isoagglutininreduktion vor AB0-inkompatibler Organtransplantation quantitativ klar beschrieben werden. Durch den Einsatz der Säulen wird eine effektive Reduktion der Isoagglutinine auf den zuvor festgelegten Zieltiter ermöglicht. Jedoch zeigte auch das nicht-isoagglutininspezifische *Immunosorba®-System* im Vergleich eine ähnlich gute Effektivität. Dieses System könnte somit zukünftig als kostengünstigere Alternative, beispielsweise bei immunisierten Patienten mit IgG-Isoagglutininen oder bei Patienten mit zusätzlichen HLA- und/oder nicht-HLA-Antikörpern, Anwendung finden. Grundsätzlich sollte nach den Ergebnissen dieser Arbeit jedoch bedacht werden, dass die Isoagglutinindepletion unabhängig vom verwendeten Säulensystem eine große intra- und interindividuelle Variabilität aufweist. Das Immunadsorptionsregime sollte daher nicht starr geführt werden, sondern im klinischen Verlauf stets reevaluiert und individuell angepasst werden. Ob und welcher Zusammenhang zwischen der erreichten Isoagglutininreduktion des Patienten- und Kontrollkollektivs und dem Hämatokrit-korrigierten Plasmavolumen besteht, konnte durch die vorliegende Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Da sich hieraus jedoch wichtige Konsequenzen für den Behandlungsplan ergeben, sollte dieser Zusammenhang in weiterführenden Arbeiten mit größerem Stichprobenumfang erneut untersucht werden. Auch die Rolle des Ausgangstiters für die Anzahl der Immunadsorptionen bleibt weiter zu evaluieren. Als größtes Problem der Isoagglutinineliminierung durch antigenspezifische IA stellte sich der zwischen den einzelnen Behandlungen auftretende Titerrebound heraus. Die noch weitestgehend unbekannten Gründe des Rebounds sowie dessen Therapieoptionen sollten daher Gegenstand weiterer Forschungen sein. Da die vorliegende Arbeit erstmalig die Effektivität der Isoagglutininreduktion durch antigenspezifische Immunadsorption evaluierte, konnte hiermit eine wesentliche Grundlage für weiterführende Arbeiten geschaffen werden. Mit Hilfe weiterer Forschung im Bereich der beiden hier beschriebenen Säulensysteme könnten in Zukunft wertvolle Informationen über die optimale Durchführung der Immunadsorptionsbehandlung vor AB0-inkompatibler Organtransplantation gewonnen werden.

## 8 Literatur- und Quellverzeichnis

- Aguilera I, Alvarez-Marquez A, Gentil MA, Fernandez-Alonso J, Fijo J, Saez C, Wichmann I, Nunez-Roldan A. 2008. Anti-glutathione S-transferase T1 antibody-mediated rejection in C4d-positive renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant*, 23 (7):2393-2398.
- Ahlenstiel T, Offner G, Strehlau J, Pape L, Froede K, Ehrich JH, Schwarz A, Heuft HG, Klempnauer J. 2006. ABO-incompatible kidney transplantation of an 8-yr-old girl with donor/recipient-constellation A1B/B. *Xenotransplantation*, 13 (2):141-147.
- Alexandre GP, Squifflet JP, De Bruyère M, Latinne D, Reding R, Gianello P, Carlier M, Pirson Y. 1987. Present experiences in a series of 26 ABO-incompatible living donor renal allografts. *Transplant Proc*, 19 (6):4538-4542.
- Amico P, Honger G, Biemann D, Lutz D, Garzoni D, Steiger J, Mihatsch MJ, Dragun D, Schaub S. 2008. Incidence and prediction of early antibody-mediated rejection due to non-human leukocyte antigen-antibodies. *Transplantation*, 85 (11):1557-1563.
- Arastéh K. 2009. *Innere Medizin*. Stuttgart: Thieme-Verlag.
- Auf der Maur C, Hodel M, Nydegger UE, Rieben R. 1993. Age dependency of ABO blood group antibodies: reexamination of an old dogma. *Transfusion*, 33 (11):915-918.
- Beimler J, Zeier M. 2007. ABO-incompatible transplantation--a safe way to perform renal transplantation? *Nephrol Dial Transplant*, 22 (1):25-27.
- Belak M, Borberg H, Jimenez C, Oette K. 1994. Technical and clinical experience with protein A immunoabsorption columns. *Transfus Sci*, 15 (4):419-422.
- Berlit P. 2005. *Therapielexikon Neurologie*. Berlin, Heidelberg: Springer- Verlag.
- Boberg KM, Foss A, Midtvedt K, Schrumpf E. 2006. ABO-incompatible deceased donor liver transplantation with the use of antigen-specific immunoabsorption and anti-CD20 monoclonal antibody. *Clin Transplant*, 20 (2):265-268.
- Bosch T. 2005. Therapeutic apheresis--state of the art in the year 2005. *Ther Apher Dial*, 9 (6):459-468.
- Breimer ME, Samuelsson BE. 1986. The specific distribution of glycolipid-based blood group A antigens in human kidney related to A1/A2, Lewis, and secretor status of single individuals. A possible molecular explanation for the successful transplantation of A2 kidneys into O recipients. *Transplantation*, 42 (1):88-91.
- Cai J, Terasaki PI, Mao Q, Pham T, El-Awar N, Lee JH, Rebellato L. 2006. Development of nondonor-specific HLA-DR antibodies in allograft recipients is associated with shared epitopes with mismatched donor DR antigens. *Am J Transplant*, 6 (12):2947-2954.
- Carter V, Shenton BK, Jaques B, Turner D, Talbot D, Gupta A, Chapman CE, Matthews CJ, Cavanagh G. 2005. Vimentin antibodies: a non-HLA antibody as a potential risk factor in renal transplantation. *Transplant Proc*, 37 (2):654-657.
- Dau PC. 1995. Immunologic rebound. *J Clin Apher*, 10 (4):210-217.

- Derksen RH, Schuurman HJ, Meyling FH, Struyvenberg A, Kater L. 1984. The efficacy of plasma exchange in the removal of plasma components. *J Lab Clin Med*, 104 (3):346-354.
- Donauer J, Wilpert J, Geyer M, Schwertfeger E, Kirste G, Drognitz O, Walz G, Pisarski P. 2006. ABO-incompatible kidney transplantation using antigen-specific immunoadsorption and rituximab: a single center experience. *Xenotransplantation*, 13 (2):108-110.
- Dragun D. 2007. The role of angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies in renal allograft vascular rejection. *Pediatr Nephrol*, 22 (7):911-914.
- Dragun D, Muller DN, Brasen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelha M, Dechend R, Kintscher U, Rudolph B, Hoebeke J, Eckert D, Mazak I, Plehm R, Schonemann C, Unger T, Budde K, Neumayer HH, Luft FC, Wallukat G. 2005. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*, 352 (6):558-569.
- Egawa H, Teramukai S, Haga H, Tanabe M, Fukushima M, Shimazu M. 2008. Present status of ABO-incompatible living donor liver transplantation in Japan. *Hepatology*, 47 (1):143-152.
- Egawa H, Tanabe K, Fukushima N, Date H, Sugitani A, Haga H. 2011. Current Status of Organ Transplantation in Japan. *Am J Transplant*.
- Egawa H, Ohmori K, Haga H, Tsuji H, Yurugi K, Miyagawa-Hayashino A, Oike F, Fukuda A, Yoshizawa J, Takada Y, Tanaka K, Maekawa T, Ozawa K, Uemoto S. 2007. B-cell surface marker analysis for improvement of rituximab prophylaxis in ABO-incompatible adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl*, 13 (4):579-588.
- Farges O, Kalil AN, Samuel D, Saliba F, Arulnaden JL, Debat P, Bismuth A, Castaing D, Bismuth H. 1995. The use of ABO-incompatible grafts in liver transplantation: a life-saving procedure in highly selected patients. *Transplantation*, 59 (8):1124-1133.
- Genberg H, Kumlien G, Wennberg L, Tyden G. 2010. Isoagglutinin adsorption in ABO-incompatible transplantation. *Transfus Apher Sci*, 43 (2):231-235.
- Genberg H, Kumlien G, Wennberg L, Tyden G. 2011. The efficacy of antigen-specific immunoadsorption and rebound of anti-A/B antibodies in ABO-incompatible kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*, 26 (7):2394-2400.
- Genberg H, Kumlien G, Wennberg L, Berg U, Tyden G. 2008. ABO-incompatible kidney transplantation using antigen-specific immunoadsorption and rituximab: a 3-year follow-up. *Transplantation*, 85 (12):1745-1754.
- Geyer M, Fischer KG, Drognitz O, Walz G, Pisarski P, Wilpert J. 2009. ABO-incompatible kidney transplantation with antigen-specific immunoadsorption and rituximab - insights and uncertainties. *Contrib Nephrol*, 162:47-60.
- Gjörstrup P, Watt R. 1990. Therapeutic Protein A Immunoadsorption. A review. *Transfusion Science*, (11):281-302.
- Glynn LE, Holborow EJ. 1959. [Distribution of blood-group substances in human tissues]. *Br Med Bull*, 15 (2):150-153.
- Gordon RD, Iwatsuki S, Esquivel CO, Tzakis A, Todo S, Starzl TE. 1986. Liver transplantation across ABO blood groups. *Surgery*, 100 (2):342-348.



- Gugenheim J, Samuel D, Reynes M, Bismuth H. 1990. Liver transplantation across ABO blood group barriers. *Lancet*, 336 (8714):519-523.
- Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. 1992. The significance of the anti-class I response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation*, 53 (3):550-555.
- Hanto DW, Fecteau AH, Alonso MH, Valente JF, Whiting JF. 2003. ABO-incompatible liver transplantation with no immunological graft losses using total plasma exchange, splenectomy, and quadruple immunosuppression: evidence for accommodation. *Liver Transpl*, 9 (1):22-30.
- Hassig A, Montandon R, Pluss HR. 1955. [Iso- and heteroimmunization in ABO blood groups in regard to the problem of O donor risks]. *Klin Wochenschr*, 33 (11-12):259-264.
- Hoffbrand A. 2003. *Grundkurs Hämatologie* Berlin, Wien: Blackwell Verlag.
- Horn M, Vollandt R, Hrsg. 1995. *Biometrie: Multiple Tests und Auswahlverfahren*. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, Mizutani K, Moreau A, Meurette A, Dantal J, Giral M, Blancho G, Cantarovich D, Karam G, Follea G, Souillou JP, Bignon JD. 2005. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*, 16 (9):2804-2812.
- Hugo C, Schott G, Eckardt KU, Wullich B. 2008. [ABO-incompatible renal transplantation--why and how?]. *Urologe A*, 47 (9):1074, 1076-1078.
- Hume DM, Merrill JP, Miller BF, Thorn GW. 1955. Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. *J Clin Invest*, 34 (2):327-382.
- Ikegami T, Taketomi A, Soejima Y, Iguchi T, Sanefuji K, Kayashima H, Yoshizumi T, Harada N, Maehara Y. 2007. Successful ABO incompatible living donor liver transplantation in a patient with high isoagglutinin titer using high-dose intravenous immunoglobulin. *Transplant Proc*, 39 (10):3491-3494.
- Ishida H, Tanabe K, Toma H, Akiba T. 2003. Therapeutic apheresis therapy for ABO-incompatible renal transplantations. *Ther Apher Dial*, 7 (6):520-528.
- Ishida H, Koyama I, Sawada T, Utsumi K, Murakami T, Sannomiya A, Tsuji K, Yoshimura N, Tojimbara T, Nakajima I, Tanabe K, Yamaguchi Y, Fuchinoue S, Takahashi K, Teraoka S, Ito K, Toma H, Agishi T. 2000. Anti-AB titer changes in patients with ABO incompatibility after living related kidney transplantations: survey of 101 cases to determine whether splenectomies are necessary for successful transplantation. *Transplantation*, 70 (4):681-685.
- Jordan SC, Kahwaji J, Toyoda M, Vo A. 2011. B-cell immunotherapeutics: emerging roles in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*, 16 (4):416-424.
- Kaido T, Uemoto S. 2010. Does living donation have advantages over deceased donation in liver transplantation? *J Gastroenterol Hepatol*, 25 (10):1598-1603.
- Kaplan AA. 1990. A simple and accurate method for prescribing plasma exchange. *ASAIO Trans*, 36 (3):M597-599.
- Kiefel V, Hrsg. 2010. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik*. 4 Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer- Verlag Berlin.

- Kim BW, Park YK, Kim YB, Wang HJ, Kim MW. 2008. Effects and problems of adult ABO-incompatible living donor liver transplantation using protocol of plasma exchange, intra-arterial infusion therapy, and anti-CD20 monoclonal antibody without splenectomy: case reports of initial experiences and results in Korea. *Transplant Proc*, 40 (10):3772-3777.
- Kretschmer V, Gombotz H, Rump G. 2008. *Transfusionsmedizin- Klinische Hämotherapie* Stuttgart: Thieme Verlag.
- Krishnan NS, Fleetwood P, Higgins RM, Hathaway M, Zehnder D, Mitchell D, Hamer R, Fletcher S, Lam FT, Kashi H, Tan LC, Imray C, Briggs D. 2008. Application of flow cytometry to monitor antibody levels in ABO incompatible kidney transplantation. *Transplantation*, 86 (3):474-477.
- Kumlien G, Wilpert J, Safwenberg J, Tyden G. 2007. Comparing the tube and gel techniques for ABO antibody titration, as performed in three European centers. *Transplantation*, 84 (12 Suppl):S17-19.
- Kumlien G, Ullstrom L, Losvall A, Persson LG, Tyden G. 2006. Clinical experience with a new apheresis filter that specifically depletes ABO blood group antibodies. *Transfusion*, 46 (9):1568-1575.
- Lindberg L, Johansson SM, Liu J, Grufman P, Holgersson J. 2011. Is there a clinical need for a diagnostic test allowing detection of chain type-specific anti-A and anti-B? *Transfusion*, 51 (3):494-503.
- Lorenz F, Hrsg. 2008. *Anzahl CD34/CD133-positiver Zellen im peripheren Blut von Patienten mit Herzinsuffizienz unterschiedlicher Schweregrade*. Jena: Thüringer Universitäts- und Landesbibliothek.
- Matic G, Hofmann D, Winkler R, Tiess M, Michelsen A, Schneidewind JM, Hebestreit G, Keysser M, Muller W, Kinze EM, Ramlow W. 2000. Removal of immunoglobulins by a protein A versus an antihuman immunoglobulin G-based system: evaluation of 602 sessions of extracorporeal immunoadsorption. *Artif Organs*, 24 (2):103-107.
- Mollison PL, Cutbush M. 1951. A method of measuring the severity of a series of cases of hemolytic disease of the newborn. *Blood*, 6 (9):777-788.
- Norden G, Briggs D, Cockwell P, Lipkin G, Mjornstedt L, Molne J, Ready A, Rydberg L, Samuelsson O, Svalander CT, Breimer ME. 2006. ABO-incompatible live donor renal transplantation using blood group A/B carbohydrate antigen immunoadsorption and anti-CD20 antibody treatment. *Xenotransplantation*, 13 (2):148-153.
- Palmer A, Taube D, Welsh K, Bewick M, Gyorstrup P, Thick M. 1989. Removal of anti-HLA antibodies by extracorporeal immunoadsorption to enable renal transplantation. *Lancet*, 1 (8628):10-12.
- Patel R, Terasaki PI. 1969. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*, 280 (14):735-739.
- Petzl DH, Tanew A. 1985. [Blood group isoagglutinins and immunoglobulins (IgG, IgM) in old age]. *Wien Klin Wochenschr*, 97 (14):595-602.
- Polayes SH, Mc NJ, Jr. 1948. Isoimmunization with the A and B factors and its relation to hemolytic disease of the newborn. *Am J Clin Pathol*, 18 (5):375-386.
- Praprotnik S, Blank M, Meroni PL, Rozman B, Eldor A, Shoenfeld Y. 2001. Classification of anti-endothelial cell antibodies into antibodies against microvascular and

- macrovascular endothelial cells: the pathogenic and diagnostic implications. *Arthritis Rheum*, 44 (7):1484-1494.
- Raut V, Uemoto S. 2011. Management of ABO-incompatible living-donor liver transplantation: past and present trends. *Surg Today*, 41 (3):317-322.
- Rego J, Prevost F, Rumeau JL, Modesto A, Fourtanier G, Durand D, Suc JM, Ohayon E, Ducos J. 1987. Hyperacute rejection after ABO-incompatible orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc*, 19 (6):4589-4590.
- Reinsmoen NL, Lai CH, Heidecke H, Haas M, Cao K, Ong G, Naim M, Wang Q, Mirocha J, Kahwaji J, Vo AA, Jordan SC, Dragun D. 2010. Anti-angiotensin type 1 receptor antibodies associated with antibody mediated rejection in donor HLA antibody negative patients. *Transplantation*, 90 (12):1473-1477.
- Renner FC, Wienzek-Lischka S, Feustel A, Bein G, Stertmann WA, Padberg W, Weimer R. 2010. Impact of pretransplant intravenous immunoglobulin administration on anti-ABO antibody levels in ABO-incompatible living donor kidney transplantation. *Transplant Proc*, 42 (10):4003-4005.
- Rieben R, Buchs JP, Fluckiger E, Nydegger UE. 1991. Antibodies to histo-blood group substances A and B: agglutination titers, Ig class, and IgG subclasses in healthy persons of different age categories. *Transfusion*, 31 (7):607-615.
- Rydberg L. 2001. ABO-incompatibility in solid organ transplantation. *Transfus Med*, 11 (4):325-342.
- Rydberg L, Breimer ME, Samuelsson BE. 1988. Antibody response in an ABO-incompatible blood transfusion. Antigen specificity and immunoglobulin class. *Transfusion*, 28 (5):483-488.
- Rydberg L, Bengtsson A, Samuelsson O, Nilsson K, Breimer ME. 2005. In vitro assessment of a new ABO immunosorbent with synthetic carbohydrates attached to sepharose. *Transpl Int*, 17 (11):666-672.
- Rydberg L, Breimer ME, Holgersson J, Karlsson KA, Nyholm PG, Pascher I, Svensson L, Samuelsson BE. 1992. Characterisation of the anti-A antibody response following an ABO incompatible (A2 to O) kidney transplantation. *Mol Immunol*, 29 (4):547-560.
- Salamon DJ, Ramsey G, Nusbacher J, Yang S, Starzl TE, Israel L. 1985. Anti-A production by a group O spleen transplanted to a group A recipient. *Vox Sang*, 48 (5):309-312.
- Sanchez-Urdazpal L, Sterioff S, Janes C, Schwerman L, Rosen C, Krom RA. 1991. Increased bile duct complications in ABO incompatible liver transplant recipients. *Transplant Proc*, 23 (1 Pt 2):1440-1441.
- Sassi M, Maggiore U, Buzio C, Franchini M. 2011. Immunohaematological and apheretic aspects of the first kidney transplant from a living, ABO-incompatible donor carried out in Italy. *Blood Transfus*, 9 (2):218-224.
- Sawada T, Fuchinoue S, Teraoka S. 2002. Successful A1-to-O ABO-incompatible kidney transplantation after a preconditioning regimen consisting of anti-CD20 monoclonal antibody infusions, splenectomy, and double-filtration plasmapheresis. *Transplantation*, 74 (9):1207-1210.
- Schenkel-Brunner H. 2000. Human blood groups: Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity. Wien, New York: Springer Verlag.

- Shapiro R, Tzakis AG, Scantlebury V, Makowka L, Watt R, Oks A, Yanaga K, Podesta L, Casavilla A, Wos S, et al. 1990. Immunodepletion in xenotransplantation. *J Invest Surg*, 3 (1):39-49.
- Shimmura H, Tanabe K, Ishikawa N, Tokumoto T, Takahashi K, Toma H. 2000. Role of anti-A/B antibody titers in results of ABO-incompatible kidney transplantation. *Transplantation*, 70 (9):1331-1335.
- Shirey RS, Cai W, Montgomery RA, Chhibber V, Ness PM, King KE. 2010. Streamlining ABO antibody titrations for monitoring ABO-incompatible kidney transplants. *Transfusion*, 50 (3):631-634.
- Shishido S, Hasegawa A. 2005. Current status of ABO-incompatible kidney transplantation in children. *Pediatr Transplant*, 9 (2):148-154.
- Sis B, Halloran PF. 2010. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant*, 15 (1):42-48.
- Skogsberg U, Breimer ME, Friman S, Mjornstedt L, Molne J, Olausson M, Rydberg L, Svalander CT, Backman L. 2006. Adult ABO-incompatible liver transplantation, using A and B donors. *Xenotransplantation*, 13 (2):154-159.
- Slapak M, Digard N, Ahmed M, Shell T, Thompson F. 1990. Renal transplantation across the ABO barrier--a 9-year experience. *Transplant Proc*, 22 (4):1425-1428.
- Sloand EM, Rezvani K. 2008. The role of the immune system in myelodysplasia: implications for therapy. *Semin Hematol*, 45 (1):39-48.
- Sonnenday CJ, Warren DS, Cooper M, Samaniego M, Haas M, King KE, Shirey RS, Simpkins CE, Montgomery RA. 2004. Plasmapheresis, CMV hyperimmune globulin, and anti-CD20 allow ABO-incompatible renal transplantation without splenectomy. *Am J Transplant*, 4 (8):1315-1322.
- Starzl TE, Koep LJ, Halgrimson CG, Hood J, Schroter GP, Porter KA, Weil R, 3rd. 1979. Fifteen years of clinical liver transplantation. *Gastroenterology*, 77 (2):375-388.
- Starzl TE, Marchioro TL, Holmes JH, Hermann G, Brittain RS, Stonington OH, Talmage DW, Waddell WR. 1964. Renal Homografts in Patients with Major Donor-Recipient Blood Group Incompatibilities. *Surgery*, 55:195-200.
- Stiegler G, Sperr W, Lorber C, Fabrizii V, Hocker P, Panzer S. 2001. Red cell antibodies in frequently transfused patients with myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol*, 80 (6):330-333.
- Takahashi K. 2005. A new concept of accommodation in ABO-incompatible kidney transplantation. *Clin Transplant*, 19 Suppl 14:76-85.
- Takahashi K, Saito K. 2006. Present status of ABO-incompatible kidney transplantation in Japan. *Xenotransplantation*, 13 (2):118-122.
- Tanabe K. 2007. Interinstitutional variation in the measurement of anti-A/B antibodies: the Japanese ABO-Incompatible Transplantation Committee survey. *Transplantation*, 84 (12 Suppl):S13-16.
- Tanabe K, Takahashi K, Sonda K, Tokumoto T, Ishikawa N, Kawai T, Fuchinoue S, Oshima T, Yagisawa T, Nakazawa H, Goya N, Koga S, Kawaguchi H, Ito K, Toma H, Agishi T, Ota K. 1998. Long-term results of ABO-incompatible living kidney transplantation: a single-center experience. *Transplantation*, 65 (2):224-228.

- Teachey DT, Felix CA. 2005. Development of cold agglutinin autoimmune hemolytic anemia during treatment for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 27 (7):397-399.
- Thaïss F. 2009. Specific issues in living donor kidney transplantation: ABO - incompatibility. *Atheroscler Suppl*, 10 (5):133-136.
- Toma H. 1994. ABO-incompatible renal transplantation. *Urol Clin North Am*, 21 (2):299-310.
- Tyden G, Kumlien G, Genberg H, Sandberg J, Lundgren T, Fehrman I. 2005. ABO incompatible kidney transplantations without splenectomy, using antigen-specific immunoadsorption and rituximab. *Am J Transplant*, 5 (1):145-148.
- Tyden G, Kumlien G, Genberg H, Sandberg J, Sedigh A, Lundgren T, Gjertsen H, Fehrman I. 2006. The Stockholm experience with ABO-incompatible kidney transplantations without splenectomy. *Xenotransplantation*, 13 (2):105-107.
- Tyden G, Donauer J, Wadstrom J, Kumlien G, Wilpert J, Nilsson T, Genberg H, Pisarski P, Tufveson G. 2007. Implementation of a Protocol for ABO-incompatible kidney transplantation--a three-center experience with 60 consecutive transplantations. *Transplantation*, 83 (9):1153-1155.
- Urbani L, Mazzoni A, De Simone P, Catalano G, Coletti L, Montin U, Morelli L, Campani D, Pollina L, Biancofiore G, Bindi L, Scatena F, Filipponi F. 2007. Treatment of antibody-mediated rejection with high-dose immunoglobulins in ABO-incompatible liver transplant recipient. *Transpl Int*, 20 (5):467-470.
- Valli PV, Puga Yung G, Fehr T, Schulz-Huotari C, Kaup N, Gungor T, Ambuhl P, Weber M, Schanz U, Seebach JD, Stussi G. 2009. Changes of circulating antibody levels induced by ABO antibody adsorption for ABO-incompatible kidney transplantation. *Am J Transplant*, 9 (5):1072-1080.
- Vongwiwatana A, Tasanarong A, Hidalgo LG, Halloran PF. 2003. The role of B cells and alloantibody in the host response to human organ allografts. *Immunol Rev*, 196:197-218.
- Weiß C, Hrsg. 2010. Basiswissen Medizinische Statistik. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Wilpert J, Geyer M, Teschner S, Schaefer T, Pisarski P, Schulz-Huotari C, Gropp A, Wisniewski U, Goebel H, Gerke P, Walz G, Donauer J. 2007. ABO-incompatible kidney transplantation-proposal of an intensified apheresis strategy for patients with high initial isoagglutinine titers. *J Clin Apher*, 22 (6):314-322.
- Winters JL, Gloor JM, Pineda AA, Stegall MD, Moore SB. 2004. Plasma exchange conditioning for ABO-incompatible renal transplantation. *J Clin Apher*, 19 (2):79-85.
- Zou Y, Stastny P, Susal C, Dohler B, Opelz G. 2007. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med*, 357 (13):1293-1300.
- Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H, Sireci G, Wang Z, Lavingia B, Stastny P. 2006. Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. *Hum Immunol*, 67 (3):230-237.

## 9 Anhang

Email der Firma Glycorex Transplantation AB, Lund, Schweden:

Dear Ms. Diana Lenk,

Thank you for your e-mail and questions. It would be interesting to take part of your results/conclusions when possible. Concerning the questions below we have the following answers (unfortunately, we are not able to answer one of the questions):

For every patient plasma volume that passes through a Glycosorb-ABO immunoadsorption column in an extra-corporal treatment, where the patient plasma is continuously returned to the patient and thus re-mixed with the patient intravascular blood volume, about 50-60 % of the patient plasma volume is treated with the column. Thus, up to 50-60% of the anti-A/B antibodies in the patient's intra-vascular blood volume can be bound to the Glycosorb-ABO column for every patient plasma volume treated. From this it can be concluded that the anti-A/B titer will be reduced by 1-2 titer steps in the patient for every treated patient plasma volume (that has passed through the column), even if the titer directly after the column is 0 or 1. From about 500 different patient plasma samples tested, it has been found that more than 90 % of the samples had titers of 0 or 1 after passage through the column. It can also be concluded that the more patient plasma volumes that are passed through the column during every single treatment session, the more the anti-A/B titer will decrease in the patient blood volume. Normally, treatment of 3 patient plasma volumes will reduce the patient titer by at least 3 titer steps. Some patients show a rebound effect and then the treatment will be less efficient (re-synthesis of antibodies). The first protocol (Huddinge) involved the treatment of 1 – 1.5 plasma volume(s) per treatment, even if the column was constructed and intended for more plasma volumes per treatment, due to the limited initial clinical experience of treating more plasma volumes with the product. In our experience the Glycosorb-ABO column is not saturated with anti-A/B antibodies even when more than 10 liters of blood donor plasma is passed through the column. Thus, later protocols involve the treatment of up to 3 or more patient plasma volumes per each treatment session. As a recent example, a pediatric ABO-inc heart transplantation, 9 patient plasma volumes were treated in each treatment session. To conclude, in theory, a single treatment session involving the treatment with several patient blood plasma volumes can lead to a sufficient titer decrease for a transplantation, provided

there is no extensive rebound after/between the treatment(s). No major side effects have been reported from e.g. Huddinge and Freiburg. It has been shown that if the titer is decreased to 1:4 or lower, the outcomes of ABO-inc and ABO-comp. LD kidney transplants are similar, also at longer follow-up, e.g. Freiburg and Huddinge experience (for example H. Genberg presentation in Vienna, Sept. 2011). We believe it is important to have as low target titer as possible on the day of transplant to achieve a lower risk of AMR/rejection due to, obviously, a) a low anti-A/B level, b) if the patient shows a rebound/increase of the anti-A/B titer post-transplant, this will start from a lower (risk)/level and give more time for treatment and c) the uncertainty of titration methods. For example if a target titer of 1:8 or 1:16 is chosen there is a risk that the anti-A/B level is higher (with higher associated risks) due the uncertainty of titration methods. From time to time, alternative anti-A/B determination methods have been proposed, introducing artificial techniques with artificial surfaces, introducing more or less non-specific interactions (e.g. ELISA or similar methods, chemically modified beads, manipulated erythrocytes, flow cytometry, chips etc) and thus, someone at least somewhat knowledgeable in bio-specific affinity, obviously, will understand that these methods give artificial and not completely correct results. Irrespective of the discussion whether the current titration methods with donor erythrocytes are good enough or not, it may be noted from a clinical standpoint, that it has been shown with the current clinical experience, that ABO-incompatible transplantation with a target titer of 1:4 or lower as achieved with the Glycosorb-ABO treatment which does not compromise the patient, is safe and gives equal results as ABO-comp. LD kidney transplants. This is in contrast to previous non-specific treatment methods. For more information see: Rydberg, Bengtsson, Samuelsson, Nilsson, Breimer, in vitro assessment of Glycosorb-ABO. *Transpl. Int.* 2005, 17(11):666-672.

We are wishing you all the best with the dissertation work.

Best regards,

Dr. Kurt Nilsson

Glycorex Transplantation AB

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name	Diana Lenk
Geburtsdatum	12.07.1986
Geburtsort	Gera
Staatsangehörigkeit	Deutsch

### **Schul Ausbildung**

03/ 2005	Abitur (Note: 1,1)
08/1997 – 03/2005	Herzog-Johann-Gymnasium Simmern
08/1993 – 07/1997	Astrid-Lindgren-Grundschule Gera

### **Studium und beruflicher Werdegang**

Ab 05/2012	Assistenzärztin an der Robert-Koch-Klinik des St. Georg Klinikums, Leipzig
10/2005 – 11/2011	Studium der Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena (Gesamtnote: 1,5)
11/2011	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2010 – 07/2011	Praktisches Jahr <ol style="list-style-type: none"><li>1. Tertial: Klinik für Innere Medizin, Spital Linth, Uznach/ Schweiz:</li><li>2. Tertial: Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena:</li><li>3. Tertial: Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Friedrich-Schiller-Universität Jena:</li></ol>
09/2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. D. Barz für die freundliche Überlassung des Themas und die Ermöglichung dieser Dissertation. Ihre kontinuierliche Unterstützung sowie die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und motivierenden Ratschläge während des gesamten Zeitraums der Promotion sowie die Durchsicht dieser Arbeit waren mit eine große Hilfe und Unterstützung.

Ich bedanke mich bei Frau Oberärztin Dr. med. S. Rummler für die wissenschaftliche und technische Einführung in die Methode der Immunadsorption sowie die fachkundige und tatkräftige Hilfe bei der Gewinnung der Blutproben und Patientendaten. Ebenso möchte ich mich bei den Krankenschwestern der Abteilung Therapeutische Hämapherese herzlich bedanken, welche mich jederzeit überaus hilfsbereit bei der Sammlung der Proben unterstützten.

Des Weiteren danke ich den medizinisch-technischen Assistentinnen der Blutbank für die freundliche Einführung in die Methode der Antikörperbestimmung.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. rer. nat. M. Walther für die fachkundige Unterstützung bei der Einarbeitung in die Statistik und in das SPSS- Programm.

An dieser Stelle danke ich zudem meiner Familie für die jahrelange Unterstützung während des Medizinstudiums und bei der Anfertigung dieser Dissertation. Ohne sie wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Mein weiterer Dank gilt Herrn Stefan Kruse und Herrn Matthias Arras für ihre motivierenden Ratschläge.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. med. habil. D. Barz, Frau Dr. med. S. Rummler und Herr Dr. rer. nat. M. Walther,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift